

**ESTUDO DO TRANSPORTE CELULAR DA SINEFRINA E DA
SUA INTERACÇÃO COM A GLUTATIONA EM SUSPENSÕES
DE CARDIOMIÓCITOS ISOLADOS DE RATO ADULTO.**



Luciana Grazziotin Rossato

MESTRADO EM TOXICOLOGIA ANALÍTICA CLÍNICA E FORENSE



“Estudo do transporte celular da sinefrina e da sua interacção com a glutathione em suspensões de cardiomiócitos isolados de rato adulto.”

Luciana Grazziotin Rossato

Dissertação de Mestrado em Toxicologia Analítica, Clínica e Forense submetida à
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Trabalho realizado sob orientação de:

Professor Doutor Fernando Remião

Professor Associado da Faculdade de Farmácia

Universidade do Porto, Porto, Portugal

Co-orientação:

Professora Doutora Vera Marisa Freitas Costa

Investigadora REQUIMTE e Professora Auxiliar Convidada

do Instituto de Ciências de Saúde do Norte, Paredes, Portugal

Junho, 2010

*É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS
PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO
INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.*

*“O Tejo é mais belo que o rio que corre pela minha aldeia,
Mas o Tejo não é mais belo que o rio que corre pela minha aldeia
Porque o Tejo não é o rio que corre pela minha aldeia,
O Tejo tem grande navios
E navega nele ainda,
Para aqueles que vêem em tudo o que lá não está,
A memória das naus.
O Tejo desce de Espanha
E o Tejo entra no mar em Portugal.
Toda a gente sabe isso.
Mas poucos sabem qual é o rio da minha aldeia
E para onde ele vai
E donde ele vem.
E por isso, porque pertence a menos gente,
É mais livre e maior o rio da minha aldeia.
Pelo Tejo vai-se para o Mundo.
Para além do Tejo há a América
E a fortuna daqueles que a encontram.
Ninguém nunca pensou no que há para além
Do rio da minha aldeia
O rio da minha aldeia não faz pensar em nada.
Quem está ao pé dele está só ao pé dele.”*

Fernando Pessoa

“O importante não é aquilo que fazem de nós, mas o que nós mesmos fazemos do que os outros fizeram de nós.”

Jean Paul Sartre

À minha família

AGRADECIMENTOS

Alguém já disse um dia que é muito bom chegar ao fim de um caminho, mas no fim, o que realmente importa, é o caminho percorrido. Por isso, neste momento, gostaria de agradecer a todas as pessoas que, de alguma forma, fizeram parte deste meu trajeto.

Primeiramente, gostaria de agradecer à Professora Doutora Maria de Lourdes Bastos pela inspiração e pela oportunidade. Minha admiração por si vem de muito antes de eu sequer imaginar realizar esta dissertação, e só aumentou no decorrer destes dois anos. Esta admiração, assim como o inigualável contributo científico, seguirão sempre comigo. Obrigada por tudo!

Ao Professor Doutor Fernando Remião agradeço por tornar este trabalho possível. Obrigada pela orientação, solicitude e por se preocupar comigo. Sempre me senti amparada humana e cientificamente. Agradeço, feliz, pela confiança e pelo privilégio de prosseguir meus estudos como sua aluna de doutoramento.

À Professora Doutora Vera Marisa Costa tenho muito a dizer. Agradeço a maneira impecável como orientou este trabalho, quer no ensinamento das técnicas laboratoriais, quer na fase final de escrita. Obrigada pela disponibilidade, rapidez, paciência, sentido crítico, honestidade, apoio e por todo o estímulo para que eu ganhasse confiança e autonomia. As coisas que me ensinastes irão comigo para além deste trabalho. Agradeço todas as palavras (os elogios e os sermões), os muitos e-mails trocados e por conseguir responder as minhas inúmeras dúvidas com respostas precisas e ao mesmo tempo instigantes. Fico feliz em saber que este é apenas o nosso primeiro trabalho e que a orientação não se finda nesta dissertação. Além da orientação, preciso agradecer a amizade e a lealdade, sentimentos hoje tão raros. Obrigada pela maneira como me recebeste na minha chegada a Portugal, quando tudo era novo. Mas mais que isso: sinto-me feliz ao perceber que, passado o tempo das novidades, reconheci uma amiga.

Agradeço a todos os demais membros e colaboradores do Serviço de Toxicologia da Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto. Me sinto orgulhosa pela minha trajetória académica passar por este laboratório, que, além da alta densidade de alunos/m², se destaca pela qualidade dos trabalhos desenvolvidos:

Ao Professor Doutor Félix Carvalho deixo a admiração por conseguir reunir entusiasmo, otimismo e rigor científico em tudo o que faz. Obrigada por todas as sugestões, pela disponibilidade e pelo exemplo.

À Professora Doutora Helena Carmo agradeço a simpatia, o interesse, o carinho e por estar sempre disponível.

Um especial agradecimento à Doutora Paula Guedes pelo auxílio em grande parte dos trabalhos realizados no âmbito desta dissertação e, principalmente, por compreender a minha relação passional com o GC/IT-MS, acreditar que as coisas dariam certo e manter a calma quando esta me faltou.

À Doutora Sónia Fraga agradeço a alegria e a boa disposição contagiante.

Ao Professor Doutor João Capela deixo o meu “muito obrigada” pela atenção, solicitude, pelas importantes palavras de incentivo e por frisar que eu não estava sozinha.

Meu sincero agradecimento à Professora Doutora Márcia Carvalho pelo entusiasmo, interesse e simpatia com que sempre me tratou.

À Professora Doutora Maria Eduarda Fernandes agradeço a solicitude, disponibilidade, simpatia e atenção.

À querida Engenheira Maria Elisa, agradeço de coração pelo carinho e zelo com que sempre me tratou. Obrigada pela companhia das manhãs, pelo incentivo por trás de todas as “balas”, cafés, palavras e mimos destinados a mim.

À Dona Julia agradeço a assistência, o carinho, a simpatia e o companheirismo e à (Dona) Ana Margarida deixo o meu agradecimento pela disposição, dedicação e por ser tão amável.

A todos os meus colegas de laboratório, investigadores e alunos, agradeço pela companhia. À Renata e sua família agradeço, em especial, pela preocupação, amizade, carinho e por tudo de bom que vivemos. Helena Pontes e Miguel: sinto saudades daqueles tempos! Aos meus colegas de mestrado, agradeço todos os bons momentos passados no início deste desafio. Ao Tiago agradeço as caronas e o auxílio técnico-informático. Obrigada, principalmente, pela nossa amizade sincera e por me “emprestar” os teus amigos quando eu não tinha nenhum!

Também agradeço a todos os meus amigos do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde tudo começou... Vocês moram no meu coração! Lembro com muito carinho de tudo que fizemos e de todos. À professora Doutora Renata Limberger, minha também amiga Re, agradeço TODAS as oportunidades, a disponibilidade, o carinho, o incentivo e tudo o que aprendi. Registro publicamente a minha admiração e o meu apreço!

Foram os portugueses que inventaram a Saudade, mas é nas palavras de uma brasileira que encontrei o que penso ser o seu melhor significado: “...é quando o momento tenta fugir para acontecer de novo e não consegue”. É o meu coração também brasileiro que esta invenção portuguesa tantas vezes habitou. Por isso, hoje, mais importante que todo o resto, é agradecer à minha família:

Aos meus avós, tios, tias, cunhados, primos e primas agradeço pela disponibilidade e por sempre me apoiarem de forma explícita. É difícil não tê-los mais no meu dia-a-dia. Por outro lado, sinto que mesmo longe continuamos próximos! Para uma família como a nossa, não há palavras suficientes que possam traduzir a solidez dos nossos laços afetivos. Que sorte a minha! Amo muito a cada um!

Aos amigos de sempre e para sempre, agradeço a alegria de cada reencontro.

Ao Ale, agradeço, primeiramente, pelo apoio incondicional desde os primeiros momentos. Quando este mestrado era uma possibilidade remota, foste o primeiro a me incentivar. Hoje esta dissertação é concreta, mas só se tornou possível porque pude contar com a tua generosidade, com o apoio constante em todas as fases, com o carinho, o amor e a dedicação. Agradeço por tudo isso e peço desculpas pelas minhas ausências. Esta dissertação também é dedicada a ti.

Aos meus pais agradeço, imensamente, acima de tudo, pelo amor que sempre alicerçou a nossa família. Obrigada pelo apoio incondicional em todas as situações. Ao meu pai agradeço pelo exemplo de determinação, caráter e bom coração e à minha mãe, pela amizade, pelo exemplo de força e solicitude. À minha irmã Lisiane agradeço por compartilhar comigo os melhores momentos da infância e de sempre, pelo companheirismo e pela amizade. Amo muito vocês.

DECLARAÇÃO:

Ao abrigo do nº2 do artigo do Decreto-Lei nº 388/70, declara-se que fazem parte integrante desta dissertação os seguintes trabalhos publicados. Para esses trabalhos, o autor da dissertação contribuiu maioritariamente na execução das experiências laborais, interpretação de resultados e preparação dos manuscritos.

PUBLICAÇÕES:

Artigos publicados ou em vias de publicação em revistas de circulação internacional com arbitragem científica incluídos nesta dissertação:

1) **Rossato LG**, Pinho PG, Silva R, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML, Costa VM, Remião F. (2010) Development and validation of a GC/IT-MS method for simultaneous quantitation of *para* and *meta*-synephrine in biological samples. J Pharm Biomed Anal. 52: 721-726.

2) **Rossato LG**, Costa VM, Pinho PG, Carvalho F, Bastos ML, Remião F. (2010). Structural isomerization of synephrine influences its uptake and ensuing glutathione depletion in rat isolated cardiomyocytes. Artigo submetido.

A sinefrina é um derivado da feniletilamina citada como o principal composto activo de suplementos alimentares naturais utilizados para o emagrecimento. A sinefrina tornou-se popular após a Food and Drug Administration (FDA) proibir o uso da efedrina em suplementos dietéticos. Além da sua utilização como agente promotor de emagrecimento, a sinefrina é uma amina biogénica presente em animais e vegetais. A sinefrina é um agonista adrenérgico inespecífico que pode existir na forma de três isómeros posicionais (*ortho o-*, *meta m-* e *para p-*); porém, apenas os isómeros *m-* e *p-* estão descritos em suplementos alimentares. O uso da sinefrina no emagrecimento despertou especial interesse em relação à sua potencial toxicidade, uma vez que a vulgarização do seu uso é acompanhada por inúmeros relatos de eventos adversos, nomeadamente ao nível do sistema cardiovascular. O isómero *m*-substituído é relatado como o mais cardiotoxico.

Apesar da relevância do estudo farmacológico da *p-* e *m*-sinefrina, são escassos os métodos adequados para a quantificação destes compostos em amostras biológicas. De igual forma, estudos mecanísticos relativos à potencial toxicidade da sinefrina são praticamente inexistentes. Assim, foi desenvolvida e validada uma metodologia de quantificação simultânea da *p-* e *m*-sinefrina por cromatografia gasosa com captura de iões acoplada à detecção por espectroscopia de massa (GC/IT-MS) em matrizes celulares. Além disso, estudou-se a relevância do transporte mediado por transportadores de catiões orgânicos (OCTs) da sinefrina e as alterações dos níveis de glutathione intracelular promovidos pela incubação com *p-* e *m*-sinefrina em suspensões de cardiomiócitos tolerantes ao cálcio isolados de rato adulto.

O método desenvolvido mostrou-se válido para a quantificação simultânea de *p-* e *m*-sinefrina em matrizes celulares. A nível celular, observou-se que o OCT3 e o OCT1 são cruciais na internalização dos dois isómeros em cardiomiócitos. Foi possível concluir que a *p-* e a *m*-sinefrina possuem perfis de toxicidade distintos, pois apenas a *m*-sinefrina levou à depleção dos níveis intracelulares de glutathione total e reduzida.

Esta dissertação permitiu dar importantes dados sobre a farmacocinética e cardiotoxicidade da sinefrina, inclusivamente elucidar o mecanismo de internalização da sinefrina nos cardiomiócitos, assim como a sua acção sobre a glutathione intracelular.

Palavras chave: *p-* e *m*-sinefrina, transportadores de catiões orgânicos, GC/IT-MS, cardiotoxicidade.

ABSTRACT

Synephrine is a derivative of phenylethylamine often cited as ‘the active component’ of several plants and dietary supplements used in weight loss. It became one of the most popular stimulants present in weight-loss products after Food and Drug Administration (FDA) interdicted the use of ephedrine-containing dietary supplements. Furthermore, synephrine is also a trace amine that can be found in animals and plants. Synephrine is an unspecific adrenergic agonist which can exist in three different positional isomers (*ortho o*-, *meta m*-, and *para p*-); however, only *p*- and *m*-synephrine have been described in weight-loss products. The growing use of synephrine has been raising concerns since it has been accompanied by several reports of adverse effects. Cardiac adverse events have been the most common adverse effects associated with synephrine intake. *m*-Synephrine is reported as the most cardiotoxic positional isomer.

In spite of the pharmacological interest in the study of *p*- and *m*-synephrine, adequate methods for their quantification in biological samples are yet to be developed. Mechanistic studies concerning the toxicological effects of both synephrine used in weight-loss are also scarce. Thus, in the present study, a sensitive gas chromatography/ion trap-mass spectrometry (GC/IT-MS) method was developed and validated for the simultaneous quantitation of *m*- and *p*-synephrine in a cellular matrix. Furthermore, we studied the role of organic cation transporters (OCTs) in the mediated conveyance of *m*- and *p*-synephrine and the intracellular glutathione levels changed by the incubation with *p*- and *m*-synephrine in calcium-tolerant freshly isolated cardiomyocytes from adult rat.

The developed GC/IT-MS method was shown to be valid for simultaneous determination of *p*- and *m*-synephrine in biological samples. The results obtained in the cardiomyocytes provide evidence that OCT3 and OCT1 seem to play a major role in the *m*- and *p*-synephrine-mediated transport into cardiomyocytes. Both *p*- and *m*-synephrine have different toxicological profile, since only *m*-synephrine induced intracellular total and reduced glutathione depletion.

This work gave important highlights about the pharmacokinetics and cardiotoxicity of synephrine, namely the mediated-transport of *p*- and *m*-synephrine into rat cardiomyocytes, as well as their action upon intracellular glutathione.

Keywords: *p*- and *m*-synephrine, organic cation transporters, GC/IT-MS, cardiotoxicity.

ÍNDICES

ÍNDICE

RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
ÍNDICES	xix
Índice	xxi
Índice de figuras	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxv
ENQUADRAMENTO.....	xxix
INTRODUÇÃO.....	1
I.1) Fontes naturais vegetais de sinefrina	4
I.2) Papel fisiológico da sinefrina.....	7
I.3) Propriedades farmacológicas da sinefrina	8
I.3.1) Relação estrutura-actividade	9
I.3.2) Farmacocinética e possíveis interacções da sinefrina	12
I.4) Suplementos alimentares e o emagrecimento: contexto de utilização.....	14
I.4.1) Composição dos suplementos alimentares contendo sinefrina.....	16
I.4.2) A eficácia da sinefrina na promoção do emagrecimento	18
I.5) A toxicidade decorrente do uso de sinefrina	19
I.5.1) Toxicidade cardiovascular associada ao uso da sinefrina	20
I.5.2) A sinefrina e o stress oxidativo	23
OBJECTIVOS	27
SECÇÃO EXPERIMENTAL	31
III.1) Desenvolvimento da metodologia de análise.....	33
III.1.1) A selecção da matriz de estudo escolhida.....	33
III.1.2) Técnica preparativa da amostra	34

III.2) Análise instrumental.....	35
III.2.1) Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa	35
III.3) Modelo experimental	36
III.3.2) Concentração utilizada	38
MANUSCRITO I	39
MANUSCRITO II.....	47
DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
IV.1) Validação do método	81
IV.2) Estudos da internalização de <i>m</i> - e <i>p</i> -sinefrina em células Caco-2	83
IV.3) Estudos do transporte de <i>m</i> - e <i>p</i> -sinefrina em cardiomiócitos tolerantes ao cálcio isolados de rato adulto	85
IV.4) A sinefrina e a depleção de glutathionas em cardiomiócitos isolados de rato	87
IV.5) Considerações finais	88
REFERÊNCIAS	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1) Estruturas químicas dos isómeros posicionais da sinefrina.	3
Figura 2) Árvore de <i>Citrus aurantium</i>	5
Figura 3) Biossíntese da <i>p</i> -sinefrina. As vias sinalizadas por (A) são as vias preferenciais de síntese nos animais; as vias sinalizadas por (B) são as vias preferenciais de síntese da <i>p</i> -sinefrina nos vegetais. (DD= dopa descarboxilase; DβH= dopamina β-hidroxilase; PNMT= feniletanolamina-N-metiltransferase) Adaptado de (19).	6
Figura 4) Estruturas químicas de compostos com semelhança estrutural com a sinefrina.	10
Figura 5) Principais enzimas envolvidas na destoxificação de espécies reactivas.	25
Figura 6) Reacção de derivatização da <i>p</i> - e <i>m</i> -sinefrina com ATFA (25).....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Anidrido acético
ATFA	Anidrido trifluoroacético
BSTFA	N, O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida
CA	<i>Citrus aurantium</i>
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CAT	Catalase
COMT	Catecol- <i>o</i> -metiltransferase
CORT	Corticosterona
DβH	Dopamina β-hidroxilase
DD	Dopa-descarboxilase
EC	Electroforese capilar
ECG	Electrocardiograma
FDA	Food and Drug Administration
HO•	Radical hidroxilo
GC	Cromatografia gasosa
GC-IT/MS	Cromatografia gasosa com captura de iões acoplada a detector de massa
GPx	Glutaciona-peroxidase
GR	Glutaciona-redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSHt	Glutaciona total
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona-S-transferase
HPLC/UV	Cromatografia líquida de alta resolução com detecção ultravioleta
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
IMC	Índice de massa corporal
LC	Cromatografia em líquida
LDH	Lactato-desidrogenase
LOD	Límite de detecção
LOQ	Límite de quantificação
MAO	Monoamina-oxidase

mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MRP	Proteínas de resistência a múltiplas drogas
MS	Detector de massa
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida
MTBSTFA	N- <i>tert</i> -butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida
NAC	N-acetil-cisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido na forma reduzida
OCT	Transportadores de catiões orgânicos
OCTN	Novos transportadores de catiões orgânicos
O ₂ • ⁻	Radical superóxido
PFPA	Anidrido pentafluoropropânico
P-gp	Glicoproteína P
PMAT	Transportador membranas plasmáticas das monoaminas
PNMT	Feniletanolamina-N-metiltransferase
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
-SH	Grupos sulfidrilos
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido-dismutase
SPE	Extracção em fase sólida
TAAR	Receptores das aminas vestigiais
TH	Tirosina-hidroxilase
Tiron	4,5-dihidroxi-1,3-benzeno ácido dissulfónico
WADA	World Anti-Doping Agency

ENQUADRAMENTO

ENQUADRAMENTO

Esta dissertação encontra-se dividida em cinco secções principais:

- **Secção I: Introdução**

Esta secção apresenta uma revisão da literatura existente sobre os aspectos gerais e utilização da sinefrina como agente promotor do emagrecimento.

- **Secção II: Objectivos**

Esta secção contém os objectivos principais e específicos desta dissertação.

- **Secção III: Secção experimental**

Esta secção compreende uma breve descrição das metodologias utilizadas e os manuscritos publicados ou em vias de publicação no âmbito desta dissertação.

- **Secção IV: Discussão e Considerações finais**

Nesta secção os resultados obtidos nesta dissertação foram integrados com o “estado da arte”. As principais conclusões dos trabalhos realizados são também apresentadas nesta secção.

- **Secção V: Referências**

Nesta secção, encontram-se as referências da literatura que foram utilizadas ao longo da presente dissertação.

Secção I)

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A sinefrina é uma das principais substâncias activas dos produtos naturais obtidos a partir de extractos de plantas, que são utilizados para induzir ou facilitar o emagrecimento. Curiosamente, esta substância é igualmente sintetizada endogenamente em baixas concentrações em animais vertebrados e invertebrados, pelo que é considerada uma amina biogénica vestigial (1).

Quimicamente, a sinefrina é um derivado da feniletilamina que pode existir na forma de três isómeros posicionais (*orto* –*o*, *meta* –*m* e *para* –*p*) dependendo da localização do hidroxilo fenólico (Figura 1) (2). Cada isómero posicional possui propriedades farmacológicas distintas e pode ainda ser encontrado na forma dextrógira ou levógira devido a presença de um carbono quiral (3, 4).

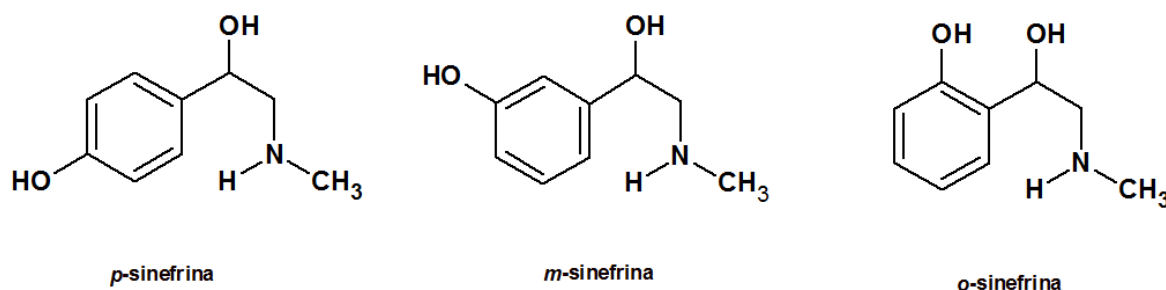


Figura 1) Estruturas químicas dos isómeros posicionais da sinefrina.

Em termos de utilização, a sinefrina é utilizada, por exemplo, na medicina tradicional asiática, no tratamento de problemas digestivos, para estimular o apetite e a secreção gástrica (5). Na região mediterrânea, é utilizada desde os tempos medievais como estimulante cardíaco, vascular e digestivo, estomáquico, sedativo, tranquilizante, colagogo e tónico geral (6). No entanto, em termos históricos e comerciais, a sinefrina apenas se tornou vulgar como composto promotor do emagrecimento em 2004, após a proibição dos suplementos alimentares contendo efedrina pela *Food and Drug Administration* (FDA). A partir desse momento, transformou-se em uma alternativa válida para a indústria dos

produtos dietéticos tornando-se, os chamados “*Ephedra-free*”, rapidamente muito populares. Algumas das reformulações alcançaram vendas superiores aos originais e, actualmente, a sinefrina figura entre os cinco estimulantes mais vendidos em suplementos alimentares usados no emagrecimento (3). Um estudo recente demonstrou que, nos Estados Unidos, uma em cada quinze pessoas consumidoras de suplementos alimentares já utilizou pelo menos um produto contendo sinefrina (7).

Devido às semelhanças estruturais e farmacológicas com a efedrina, a *World Anti-Doping Agency* (WADA) inclui a sinefrina no seu programa de vigilância desde 2009. Este programa inclui substâncias como a cafeína e a fenilpropanolamina, que embora não sejam proibidas, são monitorizadas pela WADA (8). Acrescente-se que existem registos de efeitos secundários cardíacos após o consumo de suplementos alimentares contendo sinefrina, o que levou, inclusivamente, à proibição da distribuição e venda de suplementos alimentares contendo sinefrina no Canadá (9).

Em conclusão, a sinefrina é utilizada em suplementos dietéticos usados no emagrecimento. No entanto, devido ao seu uso indiscriminado, este composto apresenta potencial tóxico (10, 11), algo que será abordado nesta dissertação.

1.1) Fontes naturais vegetais de sinefrina

A sinefrina é a principal substância activa presente em diversos citrinos, nomeadamente *Citrus sp.* [*Citrus aurantium* (CA), *C. reticulata*, *C. sinensis*, *C. deliciosa*, *C. limon*, *C. limonia*, e *C. unshiu*] e *Evodia rutaecarpa* (12-15). As fontes naturais mais comuns da sinefrina para a indústria dos suplementos dietéticos são a casca e o fruto de CA (10, 16), embora outras espécies de *Citrus sp.* possam eventualmente apresentar maiores quantidades de sinefrina (12). O CA é uma árvore frutífera da família *Rutaceae* (Figura 2) conhecida popularmente como *Bitter Orange*, laranja de Sevilha, *Sour Orange*, *Green Orange*, *Zhi Shi* e *Kijitsu* (17).



Figura 2) Árvore de *Citrus aurantium*.

A casca dos frutos imaturos de CA é a parte do vegetal que possui a maior quantidade de sinefrina (12, 15). Relativamente aos frutos, quanto menor o diâmetro do fruto, maior é a concentração de sinefrina, provavelmente porque a maturação dos frutos é acompanhada por regressão da casca (5, 15). Nos frutos imaturos de origem chinesa, o teor aproximado de *p*-sinefrina é de 0,25% (18) no entanto, em frutos da mesma espécie originários da região sul do Brasil, os valores de sinefrina variam entre 0,012% a 0,197% (15). Nas folhas de *Citrus sp.* brasileiros, o conteúdo de sinefrina varia entre 0,006% a 0,087%, confirmando que os frutos são as partes do vegetal onde a sinefrina é mais abundante (15).

Nas plantas, a *p*-sinefrina é sintetizada após a descarboxilação da tirosina em tiramina, que por sua vez é convertida em *N*-metiltiramina e posteriormente em *p*-sinefrina (19). Nos animais, a biossíntese envolve a conversão da tiramina, formada a partir da descarboxilação da tirosina, em octopamina, reacção catalisada pela dopamina β - hidroxilase (D β H). O produto desta reacção é posteriormente transformado em sinefrina pela feniletanolamina N-metil-transferase (PNMT) (5) (Figura 3).

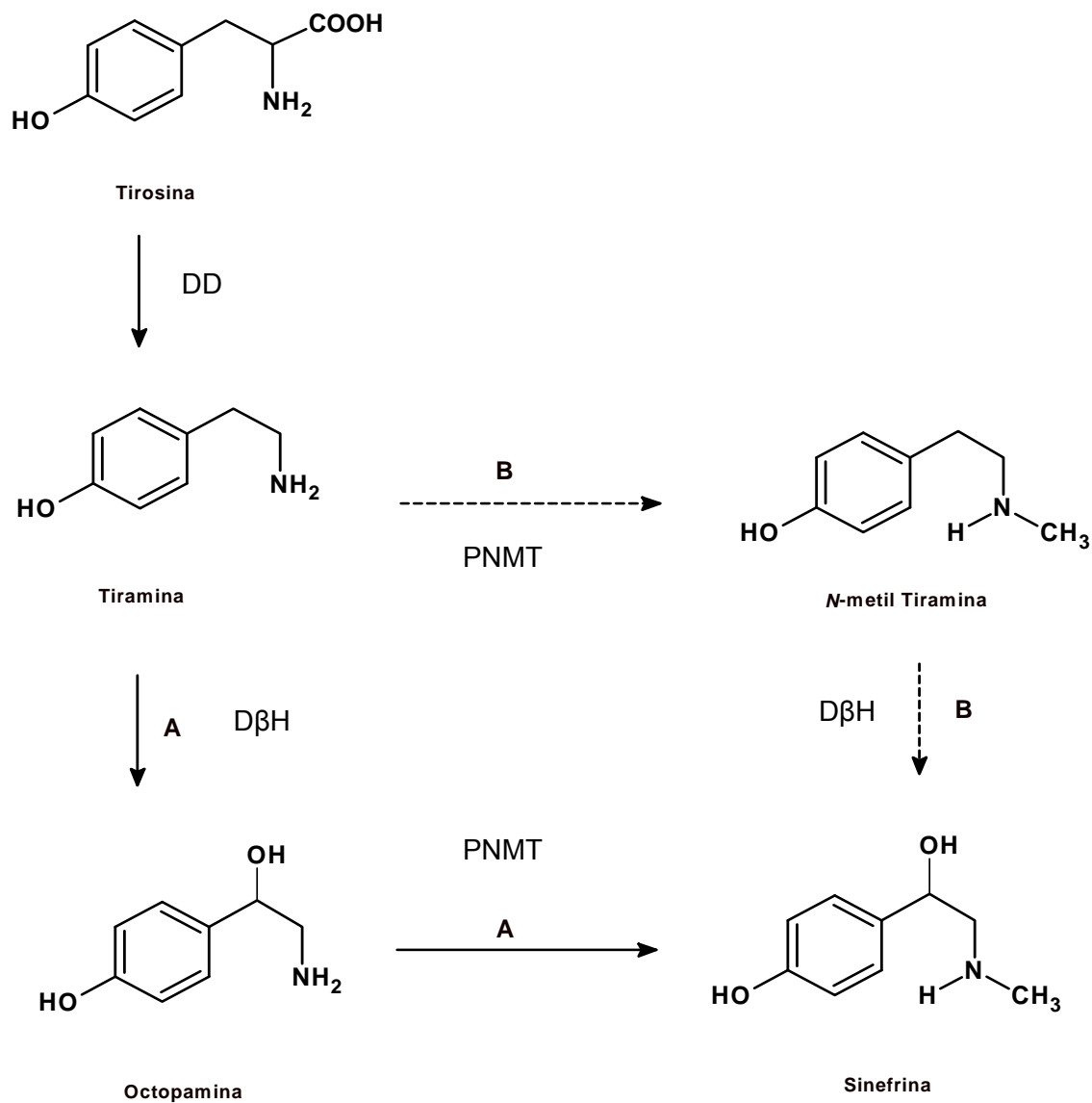


Figura 3) Biossíntese da *p*-sinefrina. As vias sinalizadas por (A) são as vias preferenciais de síntese nos animais; as vias sinalizadas por (B) são as vias preferenciais de síntese da *p*-sinefrina nos vegetais. (DD= dopa descarboxilase; DβH= dopamina β-hidroxilase; PNMT= feniletanolamina-N-metiltransferase) Adaptado de (19).

Dos três isómeros posicionais da sinefrina (*orto o-*, *meta m-*, e *para p-*) (Figura 1), a maioria dos autores afirma que apenas o isómero *p*-substituído pode ser encontrado nos frutos de CA (5, 15, 20). Porém, alguns trabalhos indicam que a *m*-sinefrina pode também estar presente (3, 21, 22). A presença de *o*-sinefrina na natureza ou no homem, bem como a sua utilização para a promoção do emagrecimento, ainda não foram documentadas (2), pelo que este isómero não será mais abordado nesta dissertação.

Cada isómero posicional pode ainda ser encontrado na forma dextrógira ou levógira (3, 4, 16). Considerando as formas enantioméricas da molécula, apenas o isómero R-(-) foi descrito em frutos (16). Contudo, é importante salientar que a utilização de altas temperaturas ou períodos de aquecimento prolongado empregues nos processos extractivos pode promover conversão óptica da sinefrina (19).

1.2) Papel fisiológico da sinefrina

Durante muito tempo, o papel fisiológico da sinefrina enquanto amina biogénica permaneceu desconhecido devido à inexistência de metodologias analíticas suficientemente sensíveis para detectar as suas baixas concentrações e à incapacidade de demonstrar a existência de receptores específicos para as aminas biogénicas (23).

A sinefrina é considerada uma “amina-vestigial” devido às baixas concentrações fisiológicas detectadas a nível plasmático (0,1-10 nM) (24-26). Embora a produção endógena das aminas biogénicas não-catecólicas, como a sinefrina, seja equivalente à biossíntese das catecolaminas, o seu tempo de semi-vida é de apenas 20 segundos (27), o que pode explicar as baixas concentrações detectadas no sangue.

As aminas biogénicas, como a sinefrina, eram consideradas neuromoduladores com efeitos simpaticomiméticos indirectos (28). Porém, a descoberta de receptores nos humanos e roedores acoplados à proteína-G com alta afinidade para as aminas vestigiais, determinou que o papel fisiológico que lhes fora atribuído fosse revisto (24, 29). Esses receptores, denominados receptores das aminas vestigiais (TAAR) estão amplamente distribuídos no organismo, inclusive em regiões do cérebro como o hipotálamo e a amígdala (23). O ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) do subtipo TAAR-1 foi descrito tanto no hipotálamo como nas regiões ventral tegmentar, *locus ceruleus* e núcleos do rafe

dorsal. Todas estas estruturas cerebrais estão relacionadas com a dor (30, 31). Actualmente, é no sistema nervoso central (SNC) que se tem maior informação acerca do papel destes receptores, onde os TAAR modulam a neurotransmissão monoaminérgica afectando redes e processos neuronais (29).

Estudos demonstram que os níveis endógenos de sinefrina encontram-se aumentados em pacientes com enxaqueca crónica, tanto nas fases de remissão como nas crises agudas (23, 30, 31). O aumento dos níveis das aminas vestigiais nesta patologia pode dever-se a disfunção hipotalâmica ou, então, segundo a hipótese metabólica, este incremento pode resultar do aumento da descarboxilação da tirosina ou da inibição da tirosina-hidroxilase (TH) (23, 31). A hipótese metabólica é corroborada pelo facto de pacientes com enxaqueca apresentarem uma diminuição dos níveis de noradrenalina plasmática. A noradrenalina é formada essencialmente a partir da acção da TH, pelo que a diminuição da sua actividade pode resultar numa menor formação deste neurotransmissor (23, 31). O significado fisiopatológico destas alterações ainda é desconhecido actualmente (23).

Além dos quadros de enxaqueca, já foram descritas alterações nos níveis de sinefrina em outras doenças como depressão, esquizofrenia, hiperactividade, doença de Parkinson e epilepsia (31-34). Além disso, estudos em células HEK293 modificadas geneticamente de modo a expressar o TAAR-1 de rato evidenciaram que xenobióticos psicoestimulantes e alucinogénios como anfetaminas, ergometrina, diidroergotamina, D-dietilamida do ácido lisérgico, bromocriptina e lisurida também são capazes de estimular o TAAR, o que sugere um potencial envolvimento destes receptores em doenças mentais e na toxicod dependência (28, 35).

1.3) Propriedades farmacológicas da sinefrina

Tanto a *m*-sinefrina quanto a *p*-sinefrina são agonistas inespecíficos dos receptores adrenérgicos, actuando sobre receptores α e β (3, 5). O mecanismo de acção da sinefrina para a promoção do emagrecimento é atribuído à estimulação da lipólise via activação dos receptores β_3 adrenérgicos e consequente oxidação das gorduras através da termogénese (36, 37). Relativamente aos receptores α , os isómeros da sinefrina actuam sobre os α_1 com uma potência de 10 a 100 vezes superior relativamente à actuação sobre os α_2 (26). Devido à estimulação dos receptores α_1 e consequentes efeitos vasoconstritores, ambos os

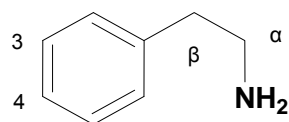
isómeros da sinefrina provocam aumento da tensão arterial (3, 5). A *p*-sinefrina é, inclusivamente, comercializada como medicamento para o tratamento da hipotensão (3). A *m*-sinefrina, também denominada fenilefrina, é um agente α_1 adrenérgico mais potente que o isómero *p*- (26) e tem sido utilizada como descongestionante nasal (2, 38), como agente vasopressor utilizado em procedimentos cirúrgicos, no tratamento agudo do priapismo e como agente midriático (3). Os efeitos mais pronunciados deste isómero podem ser, inclusive, responsáveis pelos efeitos adversos dos suplementos dietéticos contendo sinefrina.

Já foram descritos efeitos antidepressivos da sinefrina em ratos através dos testes de suspensão pela cauda (0,3 mg/Kg de S-(+)-*p*-sinefrina) e de reversão da hipotermia induzida por reserpina [0,3 mg/Kg de S-(+)-*p*-sinefrina e 1 mg/Kg de R-(-)-*p*-sinefrina] (39). Doses de 1 mg/Kg a 10 mg/Kg de *p*-sinefrina também demonstraram efeitos antidepressivos em ratinhos através de testes comportamentais (ensaio da suspensão pela cauda e de indução do nado). Os efeitos antidepressivos mais pronunciados foram obtidos com as doses de 3 e 10 mg/Kg de *p*-sinefrina (40). Os autores destes trabalhos relacionam tais efeitos da sinefrina à neuromodulação adrenérgica (39, 41).

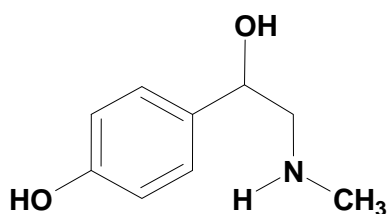
Estudos recentes em ratos evidenciaram que a sinefrina (1×10^{-7} a 3×10^{-5} mol/L) também actua sobre os receptores 5-HT_{1D} and 5-HT_{2A}, uma vez que os seus efeitos constritores na aorta foram antagonizados pelo tratamento com antagonistas serotoninérgicos selectivos (42).

1.3.1) Relação estrutura-actividade

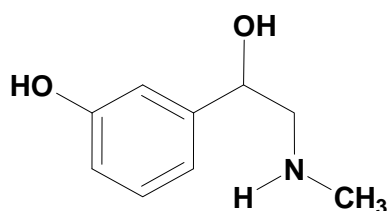
A sinefrina possui semelhança estrutural e farmacológica com outras aminas como a efedrina, a anfetamina, a adrenalina, a noradrenalina e a fenilpropanolamina (Figura 4). Todos estes compostos apresentam uma estrutura química compatível com a dos agonistas adrenérgicos (5, 25).



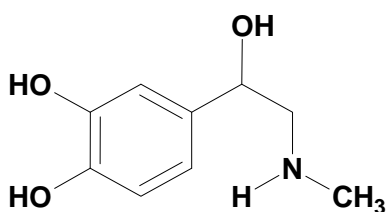
Estrutura geral das feniletilaminas



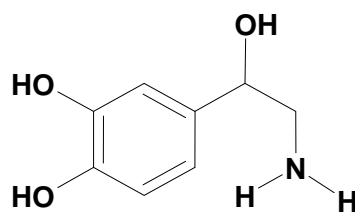
p-sinefrina



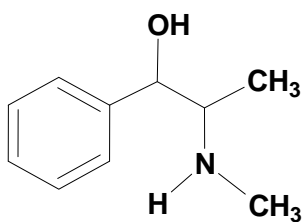
m-sinefrina



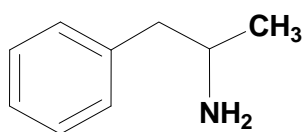
adrenalina



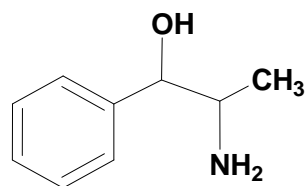
noradrenalina



efedrina



anfetamina



fenilpropanolamina

Figura 4) Estruturas químicas de compostos com semelhança estrutural com a sinefrina.

Os compostos estruturalmente semelhantes à sinefrina referidos na figura 4 têm em comum um anel aromático com uma cadeia lateral etilamina substituída (Figura 4). A diferente potência farmacológica depende das substituições no anel aromático e nos

carbonos α ou β (25). A introdução de grupos hidroxilo no carbono β e no anel aromático, além de determinar uma maior afinidade para os receptores α e β adrenérgicos, diminui a sua capacidade de entrar no SNC (25), uma vez que aumentam a polaridade da molécula. A hidroxilação do carbono β em compostos como a adrenalina, a noradrenalina, a fenilpropanolamina, a efedrina e a sinefrina determina uma menor acção central comparativamente com compostos que não possuem esta substituição como, por exemplo, a anfetamina (Figura 4) (37).

Estudos de química computacional demonstraram que os grupos hidroxilos nos resíduos de serina 204 e 207 dos receptores β adrenérgicos são cruciais para a sua activação, uma vez que estabelecem ligações de hidrogénio com os grupos hidroxilo catecólicos (43). Quando as posições 3 e 4 do anel aromático não se encontram substituídas, a actividade adrenérgica é bastante reduzida (37). Além disso, a hidroxilação na posição 3 do anel aromático determina uma maior actividade nos receptores α adrenérgicos da *m*-sinefrina em comparação com o isómero *p*- substituído (16). Considerando a isomeria óptica, o enantiómero R-(-) é descrito como duas vezes mais potente do que o isómero S-(+) relativamente à activação dos adrenoreceptores (16).

Quanto maior o substituinte associado ao grupo amínico da cadeia lateral, maior é a afinidade para os receptores β adrenérgicos (37). É esta característica estrutural que determina, teoricamente, uma maior actividade β adrenérgica de compostos como a adrenalina, a sinefrina e a efedrina quando comparados com a noradrenalina, a anfetamina e a fenilpropanolamina (Figura 4).

A sinefrina difere estruturalmente da adrenalina por não possuir estrutura catecólica (Figura 4). Considerando a afinidade para os receptores α_1 adrenérgicos, a noradrenalina é o composto mais potente, seguido pela *m*-sinefrina e, com menor potência, pelo isómero *p*- substituído (26).

A ausência de uma estrutura catecólica em moléculas como a sinefrina, determina que estas substâncias não sejam degradadas pela catecol-*o*-metiltransferase (COMT). Substituições no carbono α , como as presentes nas moléculas da efedrina, anfetamina e fenilpropanolamina, impedem a acção da monoamina-oxidase (MAO) (37, 44), o que prolonga a sua duração de acção (37). A sinefrina não possui substituintes no carbono α , pelo que sofre desaminação oxidativa pela MAO (45).

Considerando os receptores TAAR, as aminas biogénicas secundárias como a sinefrina apresentam uma maior potência nos TAAR quando comparadas com aminas primárias, como a tiramina, a triptamina e a octopamina (24). A estimulação de TAAR cardíacos pelas aminas vestigiais promove um efeito inotrópico negativo, contrastando com o efeito inotrópico positivo que advém da estimulação dos receptores β adrenérgicos (46).

1.3.2) Farmacocinética e possíveis interações da sinefrina

Os mecanismos farmacocinéticos da sinefrina estão pouco caracterizados, existindo apenas alguns estudos a que daremos atenção nos parágrafos seguintes.

Em humanos, a ingestão de 5,5 mg de sinefrina origina um pico de concentração plasmática menor que 1 ng/mL (11). Após a administração de doses únicas de sinefrina por via oral, os picos de concentração plasmática máximos são atingidos em 1-2 h (3), evidenciando uma rápida absorção (47).

Apesar de existir uma metodologia analítica validada para estudos farmacocinéticos de compostos polifenólicos bioactivos aplicável à sinefrina (48), não existem ainda estudos sobre o seu perfil de distribuição. Sabe-se no entanto, que o tempo de semi-vida plasmático da sinefrina é de 2-3 h (3).

Relativamente ao processo metabólico, e como já mencionado nesta dissertação, a sinefrina não é degradada pela COMT mas é substrato da MAO (37). Esta reacção resulta na produção de ácido *p*- ou *m*-hidroximandélico e peróxido de hidrogénio (H_2O_2), este último que pode contribuir para uma condição de stress oxidativo em presença de elevadas concentrações de sinefrina (28). Estudos demonstram que a sinefrina é metabolizada preferencialmente pela MAO A e, em menor extensão, pela MAO B (45). A sinefrina também pode sofrer reacções de metabolismo de fase II, nomeadamente glucuronidação e sulfonação (49).

Considerando a excreção, 80% da dose total administrada de sinefrina por via oral parece ser eliminada em 24 h na urina (3). Em humanos, após administração por via oral da sinefrina, os produtos maioritários da excreção na urina são a sinefrina sulfatada (47%) e o ácido hidroximandélico (30%). Como produtos minoritários, são excretados o hidroxifenilglicol sulfato (6%) e a sinefrina conjugada com glucuronideo (12%) (49).

Acrescente-se que Kusu e colaboradores observaram que cerca de 20 a 50% da (-)-sinefrina ingerida foi eliminada na sua forma conjugada e cerca de 10% como (+)-sinefrina conjugada. Os autores postularam que a (-)-sinefrina poderia ter sofrido uma interconversão *in vivo* para o isómero (+)- (50). Contudo, como aliás já fora mencionado, é necessário ter cautela na interpretação destes resultados uma vez que as amostras de urina foram hidrolisadas a 100 °C e altas temperaturas podem promover isomerização óptica da sinefrina (19).

Um estudo recente com indivíduos não sedentários que ingeriram 21 mg de sinefrina demonstrou que a prática de exercício físico de intensidade moderada não alterou a farmacocinética da sinefrina. O pico de concentração plasmática desta amina simpaticomimética após essa dose única foi inferior a 2 ng/mL (11, 51).

Relativamente às potenciais interações, um estudo demonstrou que a associação de sinefrina e cafeína não altera os seus perfis farmacocinéticos (11). Porém, é importante salientar que extractos de CA, toranja (*Citrus paradisi*) e pomelo (*Citrus maximi*) contêm flavonóides (como a 6',7'-di-hidroxi-bergamotina, bloqueador selectivo da isoenzima citocromo P450 3A4 intestinal e hepática) que podem afectar o metabolismo de outros fármacos (5). O CA contém igualmente a bergaptina, uma furanocumarina que também inibe o citocromo P450 3A4, mas em menor extensão que a 6',7'-di-hidroxi-bergamotina (52). No entanto, como o CA possui ambos os inibidores, possivelmente tem um efeito mais pronunciado, e consequentemente, pode resultar em um aumento da concentração sanguínea de vários xenobióticos, visto que a isoenzima P450 3A4 metaboliza mais que um quarto dos fármacos utilizados actualmente (5, 53).

O uso concomitante de sinefrina e inibidores da MAO pode acarretar o aumento na concentração de sinefrina e catecolaminas circulantes. Este aumento dos níveis das catecolaminas biogénicas e da sinefrina promove efeitos secundários resultantes da estimulação excessiva dos receptores adrenérgicos (28). As possíveis interações são agravadas pelo facto de que, muitas vezes, os consumidores de suplementos alimentares contendo CA fazem-no sem o conhecimento do seu médico.

I.4) Suplementos alimentares e o emagrecimento: contexto de utilização.

Considerando que mais de mil milhões de adultos apresentam excesso de peso, definido por um Índice de Massa Corporal (IMC) de 25 a 29,9 Kg/m², e que, pelo menos 300 milhões de pessoas podem ser consideradas clinicamente obesas (IMC \geq 30 Kg/m²), a obesidade atinge proporções epidémicas actualmente (54). Esta situação tem um grande impacto na sociedade, configurando-se como um problema de saúde pública, na medida em que a obesidade está associada a um maior risco de desenvolvimento de várias doenças, nomeadamente *diabetes mellitus*, problemas cardiovasculares, hipertensão e até alguns tipos de cancro (54-56).

Além dos indivíduos com indicação médica para emagrecer, o culto à magreza vigente nas nossas sociedades contribui para que indivíduos com IMC normal também procurem formas de emagrecer. A adopção de dietas hipocalóricas e a inclusão de exercícios físicos na rotina são medidas que podem resultar na diminuição de gordura corporal. No entanto, para otimizar os resultados, é comum a aquisição de medicamentos e/ou suplementos dietéticos com o objectivo de diminuir o apetite através de efeitos anorécticos ou acelerar o metabolismo por mecanismos termogénicos (17).

Entre as abordagens adoptadas para perda de peso, os produtos naturais costumam ser bem aceites pela população. O rótulo de “produto natural” geralmente é interpretado como uma garantia de segurança e inocuidade (57). A população assume que “o natural não faz mal” e, por conseguinte, acredita que substâncias naturais podem promover o gasto calórico sem causar reacções adversas. Essa crença, somada à facilidade de acesso, contribui para a aquisição de produtos para emagrecer à base de plantas (36).

A norma legal que regulamenta o comércio dos suplementos alimentares em Portugal é a Directiva Comunitária 2002/46/CE, que define os componentes permitidos nestes produtos, tais como vitaminas, minerais, aminoácidos, ácidos gordos essenciais, fibras, plantas e extractos de ervas, entre outros (58). Os fabricantes são instruídos a incluírem o teor de cada constituinte no rótulo, porém, não há nenhum órgão incumbido de verificar o conteúdo declarado. Além disso, a legislação geralmente assume que os suplementos alimentares são seguros até que se prove o contrário (17). Dessa forma, os riscos associados a tais produtos, além da toxicidade intrínseca dos seus constituintes, advém de adulterações e/ou controlo de qualidade deficiente (10). Estudos recentes demonstram que suplementos à base de ervas e extractos de plantas são frequentemente

adulterados com metais pesados como arsénio e mercúrio, hormonas (incluindo corticosteróides, testosterona e dietilstilbestrol), agentes anti-inflamatórios (ácido acetil-salicílico, indometacina e fenacetina) e outros fármacos, como teofilina, diazepam e até mesmo sildenafil (59-61). Acrescente-se que casos de sobredosagens com este tipo de produtos dietéticos são habituais, até porque geralmente são utilizados sem o conhecimento e o acompanhamento de um especialista (7, 62).

Cerca de 15,2% da população adulta americana já consumiu em alguma ocasião suplementos alimentares visando emagrecer. Desses, 74% utilizaram produtos à base de estimulantes como cafeína, efedrina ou CA (7).

Os derivados anfetamínicos foram utilizados pela primeira vez com o objectivo de promover o emagrecimento na década de 30 (63). Dados recentes demonstram que 19,8% dos pacientes obesos que procuram tratamento já utilizaram anfetaminas pelo menos uma vez (64). Esses compostos são sintetizados a partir do aminoácido tirosina (65) e os mais vulgarmente usados para a perda de peso são a anfepramona e o femproporex. O seu mecanismo de acção envolve a estimulação directa dos receptores adrenérgicos, mas principalmente a indução da libertação da serotonina e das catecolaminas noradrenalina, adrenalina e dopamina pelas vesículas sinápticas, actuando nas regiões hipotalâmica e límbica do cérebro (66). Estes neurotransmissores activam os respectivos receptores, resultando numa exacerbação da estimulação simpática dependente da dose de anfetamina administrada (67). Além disso, as anfetaminas causam alterações nos centros de saciedade por um mecanismo mediado pelo hipotálamo lateral, o que promove um efeito anoréctico (63, 65). Os efeitos comportamentais das anfetaminas (euforia e comportamento estereotipado) estão relacionados com a libertação central de dopamina (66).

O uso de agentes anfetamínicos está associado ao aparecimento de efeitos adversos relacionados ao excesso de estimulação catecolaminérgica central e periférica, além de resultarem em situações de abuso e dependência. Estudos alertam, ainda, para o grande potencial que estes compostos possuem de causar tolerância após apenas poucas semanas de tratamento (64). Devido a este perfil toxicológico, mas também devido às dúvidas quanto à sua eficácia a longo prazo, o uso dos derivados anfetamínicos para a promoção do emagrecimento está actualmente desaconselhado (66).

A efedrina actua no sistema nervoso simpático através da acção directa nos receptores α e β adrenérgicos dos órgãos efectores. A efedrina actua também por estimulação indirecta devido à libertação de noradrenalina e dopamina das vesículas sinápticas (68). Os efeitos farmacológicos da efedrina que determinaram a utilização de suplementos alimentares à base de *Ephedra sp.*, também conhecidos como *Ma Huang*, são o aumento da libertação de catecolaminas, a estimulação dos receptores β_3 adrenérgicos no tecido adiposo e o seu consequente efeito termogénico (69). Porém, como a sua actividade simpaticomimética é inespecífica, a efedrina também exerce efeitos sobre o débito cardíaco e aumenta a pressão arterial (70). Aliás, os eventos adversos cardiovasculares relacionados com o seu uso para o emagrecimento motivaram a proibição de utilização da efedrina para fins dietéticos pela FDA (71).

A fenilpropanolamina apresenta propriedades farmacológicas semelhantes à efedrina com aproximadamente a mesma potência, excepto a sua menor estimulação central. Os riscos de acidentes vasculares associados ao seu uso levaram a FDA a proibir a presença da fenilpropanolamina em produtos de venda não sujeitos à receita médica a partir de 2005 (37).

1.4.1) Composição dos suplementos alimentares contendo sinefrina

Os suplementos alimentares feitos com extractos de CA são padronizados para conter, geralmente, entre 4 a 6% de sinefrina, mas também são relatados casos extremos onde o teor pode chegar a 95% (12). Há igualmente produtos que utilizam a sinefrina isolada como componente activo, quer extraída da natureza, quer de origem sintética. O teor de sinefrina presente nos suplementos alimentares é bastante variável, assim como as indicações quanto às doses recomendadas pelos fabricantes, mas a maioria contém entre 10 a 40 mg de sinefrina por dose (17).

Tal como referido anteriormente neste trabalho, a legislação que regula o mercado dos suplementos alimentares obriga os fabricantes a declarar a sua composição (58), mas não existe uma fiscalização rigorosa que avalie a concordância entre os teores reais e os descritos nos rótulos. Dessa forma, muitos produtores aproveitam-se desta lacuna legal e introduzem no mercado produtos de composição real diferente dos teores declarados, quer por má índole, quer por um controlo de qualidade deficiente no fabrico. Esta situação

foi evidenciada por Niemann e colaboradores que analisaram os teores de sinefrina em suplementos alimentares comercializados. Os rótulos não representavam a realidade do conteúdo. Inclusivamente em dois dos suplementos que supostamente continham sinefrina, esta estava ausente, enquanto que mais de um terço dos produtos apresentaram níveis de sinefrina 80% abaixo do declarado e cerca de um quinto excediam em 120% o teor de sinefrina descrito no rótulo (72).

Apesar de apenas os enantiómeros (-)- terem sido descritos nos frutos de CA, em extractos secos de suplementos alimentares observou-se a presença de isómeros (+)- (16). A presença dos isómeros (+)-, no entanto, pode resultar da interconversão dos enantiómeros durante a extracção da sinefrina dos frutos por processos que utilizam altas temperaturas e longos períodos de refluxo (19). Da mesma forma, embora a literatura científica actual não apresente um consenso sobre a existência ou não da *m*-sinefrina nos frutos de CA, em alguns suplementos dietéticos a presença deste isómero está comprovada (2-4, 21, 22, 73). Considerando que a *m*-sinefrina é mais potente do que a *p*-sinefrina na estimulação dos receptores adrenérgicos, não se descarta a possibilidade de adulteração dos produtos ditos naturais com este isómero visando efeitos mais significativos (2, 4).

A maioria dos produtos contendo sinefrina consiste em associações de diversos compostos, uma vez que combinações de diferentes estimulantes optimizam a eficácia da sinefrina na promoção do emagrecimento (3, 5, 11). Embora a composição seja bastante variável em termos de constituintes e dosagens, os ingredientes associados com maior frequência à sinefrina são a cafeína, o guaraná, a salicina e a efedrina (5).

A cafeína figura em primeiro lugar nestas associações. Os produtos usados no emagrecimento frequentemente contêm quantidades generosas deste estimulante, equivalentes, por exemplo, aos níveis de cafeína encontrados em quatro chávenas de café ou dez chávenas de chá (5). Nos produtos que visam o emagrecimento, a cafeína promove a termogénese através do aumento da adenina monofosfato cíclico (cAMP) intracelular resultante da inibição das fosfodiesterases responsáveis pela sua degradação (66). O aumento do cAMP faz com que haja uma maior transcrição de genes de proteínas desacopladoras mitocondriais, e como consequência, a energia advinda da fosforilação oxidativa é dissipada na forma de calor (74). A partir de 100 mg de cafeína, os seus efeitos termogénicos duram entre 1 a 2 h (5). Além destes efeitos, a cafeína também possui efeitos estimulantes no SNC através do antagonismo dos receptores da adenosina, nomeadamente promovendo a redução da fadiga, o aumento da concentração e a

diminuição do tempo de reacção (66), efeitos frequentemente desejados pelos consumidores de suplementos dietéticos. A cafeína tem-se demonstrado eficaz na promoção da lipólise e, quando associada a outras substâncias termogénicas, como a sinefrina, a sua eficácia parece ser potenciada (5, 75).

1.4.2) A eficácia da sinefrina na promoção do emagrecimento

Até o momento, não há provas contundentes da eficácia da maioria dos ingredientes dos suplementos alimentares na promoção do emagrecimento a curto prazo (menos que 6 meses) e não existem estudos avaliando os seus efeitos a longo prazo (mais que 12 meses) (7). Ainda assim, esses produtos são amplamente utilizados pela população.

Estudos em ratinhos demonstraram que a administração de *p*-sinefrina nas doses de 300 mg/Kg ou de extractos de CA (5000 e 10000 mg/Kg padronizados em 3% de *p*-sinefrina) não alteraram significativamente a temperatura corporal (15). Ensaio duplamente cegos contra um placebo em humanos confirmam estes resultados, uma vez que não foram observadas diferenças significativas na temperatura corporal nos indivíduos submetidos a tratamento com um suplemento alimentar contendo 21 mg de sinefrina e 304 mg de cafeína após exercício físico moderado (11). Aparentemente, apenas altas concentrações de sinefrina (0.1-1 mM) promovem termogénese em humanos, hamsters e cobaias (76).

Arbo e colaboradores observaram que, embora o peso corporal não se tenha alterado significativamente ao longo dos tratamentos, ratos tratados com *p*-sinefrina (30 e 300 mg/Kg) por 28 dias, ganharam menos peso comparativamente com os animais do grupo controlo (77). Da mesma forma, os resultados de Calapai e colaboradores demonstram uma diminuição dependente da dose no consumo de alimentos e no ganho de peso em ratos tratados com 2,5, 5,0, 10, e 20 mg/Kg de extractos de CA (4 e 6% de sinefrina), por 15 dias (78).

A administração a humanos de 20 mg de *m*-sinefrina por via oral 3 vezes por dia, por 8 semanas, não foi eficaz na promoção do emagrecimento (73). Contudo, Hoffman e colaboradores verificaram que a associação de 20 mg de sinefrina, 317 mg de cafeína e outros estimulantes promoveu um aumento no gasto energético em humanos (79).

Bent e colaboradores, após uma revisão sistemática de estudos realizados em humanos entre 1966 e 2004, concluíram que não há provas contundentes de que os produtos contendo sinefrina usados no emagrecimento sejam eficazes para este propósito (22, 73). Devido a escassez de estudos robustos que assegurem a eficácia da sinefrina, Fugh-Berman e colaboradores concluíram que, nas doses declaradas nos suplementos dietéticos, a utilização deste composto para a promoção do emagrecimento não se justifica (5).

1.5) A toxicidade decorrente do uso de sinefrina

Os produtores de suplementos alimentares contendo sinefrina frequentemente descrevem-nos como sendo isentos de riscos. Porém, como já mencionado nesta dissertação, a sinefrina é uma molécula com propriedades químicas e farmacológicas similares a outras aminas simpaticomiméticas e, como tal, a sua utilização pode levar ao aparecimento de efeitos adversos. Existem poucos estudos relativos à segurança da sinefrina como estimulador da perda de peso. Contudo, alguns estudos *in vivo* e os relatos de toxicidade que acompanham a crescente utilização de suplementos alimentares contendo sinefrina demonstram o potencial toxicológico deste composto.

Ensaio de toxicidade aguda com extractos de CA em ratinhos evidenciaram uma diminuição da actividade locomotora nos animais submetidos a doses de 1000, 2500, 3500 e 5000 mg/Kg de CA (contendo 2,5% de sinefrina) (15). Em ratinhos tratados com *p*-sinefrina, além da diminuição da actividade locomotora, observou-se piloereção, salivação e exoftalmia nas doses de 300, 450, 600, 800, 1000 e 2000 mg/Kg. Esses efeitos evidenciaram uma toxicidade aguda transitória, uma vez que persistiram apenas por 3 a 4 h e foram atribuídos à estimulação adrenérgica (15).

Doses de 50 mg/Kg/dia de *p*-sinefrina, administradas por três dias, promoveram uma redução na massa relativa das glândulas adrenais em ratos fêmeas imaturas. Este efeito parece estar relacionado com a promoção de vasoconstrição e consequente redução do líquido no órgão devido ao agonismo α_1 adrenérgico da *p*-sinefrina (80).

Considerando os relatos de toxicidade em humanos, Sultan e colaboradores descreveram o caso de uma mulher que apresentou um quadro de colite isquêmica uma

semana após o início de um tratamento com um suplemento alimentar contendo CA. O suplemento usado foi identificado como o agente causador desta patologia, uma vez que o quadro de colite isquêmica está relacionado com a diminuição do fluxo sanguíneo para o tracto gastrointestinal e pode resultar dos efeitos vasoconstritores dos ingredientes do dito produto dietético. Cada cápsula do suplemento alimentar possuía 334 mg de extracto de CA, 300 mg de *Garcinia camboja*, 250 mg de carnitina, 250 mg de quitosano e 200 µg de arginato de crómio (81). Noutro relato, uma mulher de 21 anos, após consumir um suplemento alimentar contendo CA por três semanas, apresentou convulsões que, segundo o neurologista responsável pelo caso, foram causadas pelo consumo do produto. Porém, as razões que fizeram o médico relacionar o incidente ao suplemento não foram perfeitamente esclarecidas (3).

1.5.1) Toxicidade cardiovascular associada ao uso da sinefrina

Os mecanismos de acção ergogénica dos agentes simpaticomiméticos como a sinefrina incluem o aumento do débito cardíaco e do gasto energético através de estimulação central (51).

As células musculares cardíacas têm uma baixa capacidade de regeneração, no entanto, danos não fatais no miocárdio podem desencadear respostas adaptativas (82). Essas respostas adaptativas no miocárdio estão associadas a um aumento da massa cardíaca, com alterações no formato do coração, que podem comprometer a anatomia e a funcionalidade do órgão (83). Os fenómenos maladaptativos surgem de uma tentativa do coração minimizar os possíveis danos sofridos e podem ter como consequência o estabelecimento da falha cardíaca.

Os efeitos adversos mais frequentemente associados ao uso de suplementos dietéticos à base de sinefrina são os que afectam o sistema cardiovascular. Durante o período compreendido entre Janeiro de 1998 e Fevereiro de 2004, a *Health Canada* registou 16 casos de sintomas cardiovasculares classificados como graves causados, supostamente, por produtos contendo CA ou sinefrina (9). Graças a isso, esse organismo regulatório proibiu o uso de sinefrina em suplementos dietéticos no Canadá (9). Além dos casos ocorridos no Canadá, a crescente utilização da sinefrina como composto promotor do emagrecimento é acompanhada por um aumento de relatos da sua suposta cardiotoxicidade, que serão abordados com maior detalhe nos parágrafos seguintes.

Um estudo prospectivo, randomizado e duplamente cego foi elaborado para avaliar os efeitos de um suplemento alimentar contendo 900 mg de extracto de CA padronizado com 6% de sinefrina em humanos saudáveis e com IMC <30. Foi registado um aumento significativo da pressão sistólica desde a primeira hora até 5 h após a administração e o aumento do ritmo cardíaco a partir da segunda hora após o consumo do suplemento, efeito esse que persistiu por 5 h (84). Em outro trabalho, a administração oral de 10 mg de sinefrina foi suficiente para promover um aumento da resistência periférica total durante 30 a 60 min em voluntários saudáveis (85). Além da vasoconstrição periférica, a sinefrina pode causar arritmias ventriculares e aumento do débito cardíaco (86, 87).

Hofstetter e colaboradores verificaram um aumento na contracção do ventrículo esquerdo em humanos submetidos a tratamento intravenoso (infusão contínua) de sinefrina (4 mg/min) (86).

Em 2006, Gange e colaboradores descreveram o caso de uma paciente que desenvolveu um quadro de angina variante após o consumo por 35 dias de um produto contendo extracto de CA. Os autores concluíram que, provavelmente, tratava-se de uma pessoa susceptível a problemas cardiovasculares que apresentou o seu primeiro episódio de angina provocado pelo uso regular de sinefrina (88).

Bouchard e colaboradores descreveram o caso de uma paciente de 38 anos, sem história prévia de doença cardiovascular ou factores de risco, que desenvolveu um quadro de isquemia cerebral após o consumo diário por uma semana de um produto contendo *p*-sinefrina. A paciente alegou ter ingerido uma a duas cápsulas por dia, embora as instruções do fabricante recomendassem o consumo de três cápsulas diárias, sendo que cada cápsula continha 6 mg de *p*-sinefrina e 200 mg de extractos de *kola nut*. Como agentes simpaticomiméticos como a sinefrina podem causar isquemia periférica, coronária e/ou cerebral devido a vasoespamos, a equipa médica associou o caso ao consumo do suplemento alimentar (44).

Nykamp e colaboradores publicaram o caso de uma mulher de 55 anos com um enfarte agudo do miocárdio associado ao uso durante um ano de um suplemento alimentar contendo 300 mg de CA. A paciente não possuía qualquer antecedente de doença cardiovascular antes daquela hospitalização (89). Recentemente, foi descrito mais um caso de enfarte do miocárdio com aumento do intervalo QT algumas horas após a ingestão de um suplemento alimentar *Ephedra-free* contendo sinefrina. O paciente tinha

24 anos e não possuía qualquer factor de risco para doenças cardiovasculares (90). A literatura reporta, ainda, a ocorrência de um episódio de fibrilação ventricular em uma mulher saudável de 27 anos associado ao consumo de um produto contendo sinefrina (91).

Um estudo *in vivo* com ratos tratados por 15 dias com CA nas doses de 2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg (dois tipos de extractos padronizados a 4% e 6% de sinefrina). Os resultados demonstraram um aumento significativo da mortalidade nos animais tratados. Os autores observaram alterações no electrocardiograma (ECG), nomeadamente arritmias ventriculares associadas ao alargamento da onda QRS. Essas alterações foram observadas em todos os grupos tratados com CA a partir do quinto dia de tratamento e persistiram 15 dias depois do fim do tratamento (78).

A toxicidade cardíaca da sinefrina pode ser agravada devido às associações deste composto com outros estimulantes cardíacos. Aparentemente, a associação da sinefrina com a cafeína tem o mesmo potencial de causar efeitos adversos cardiovasculares graves, nomeadamente arritmias, hipertensão, enfarte do miocárdio e isquemia, que a combinação de efedrina e cafeína (92). Inclusivamente dos 16 casos de efeitos cardiovasculares graves que levaram a *Health Canada* a decretar a proibição do uso de sinefrina na perda de peso, apenas um se referia a um produto contendo apenas o extracto de CA. Em 7 casos, a sinefrina estava associada à cafeína e em 8 casos estava combinada com cafeína e efedrina. Dois indivíduos que ingeriram os suplementos com sinefrina, cafeína e efedrina faleceram de complicações cardíacas, demonstrando que associações podem potenciar significativamente os efeitos adversos destes agentes simpaticomiméticos (9).

Após a ingestão de 3 cápsulas de um suplemento alimentar que continha 317 mg de cafeína e 20 mg de sinefrina, verificou-se uma elevação no ritmo cardíaco e na pressão sistólica comparativamente ao grupo placebo, assim confirmando a forte resposta inotrópica da associação (75). O mecanismo da acção inotrópica positiva é promovido pelos isómeros posicionais da sinefrina em músculo ventricular isolado de cobaia nas doses de 10^{-4} a 3×10^{-4} M de *m*-sinefrina e 3×10^{-4} M de *p*-sinefrina. Este efeito foi atribuído à capacidade dos isómeros de estimular os receptores β adrenérgicos (93).

Haller e colaboradores observaram que a ingestão de 46,9 mg de extracto de CA não promoveu significativas alterações hemodinâmicas; em contrapartida a multi-associação de 5,5 mg de sinefrina, 239,2 mg de cafeína e outros estimulantes promoveu o aumento na pressão sistólica e diastólica em humanos normotensos. O ritmo cardíaco aumentou nos dois tratamentos (sinefrina isoladamente e sinefrina em associação) e foi atribuído à

estimulação β adrenérgica causada pela sinefrina (11). O consumo de 21 mg de sinefrina associada a 303,8 mg de cafeína não promoveu o aumento do ritmo cardíaco, embora a pressão diastólica tivesse aumentado significativamente nos indivíduos que participaram do estudo (51).

Outro caso de aparente toxicidade cardíaca com associações foi reportado numa paciente que utilizou um suplemento alimentar contendo sinefrina e cafeína por um ano. Após interromper o seu uso por três meses, apresentou uma síncope com perda de consciência enquanto fazia exercício. A paciente tinha reiniciado o consumo do produto na véspera, não possuía qualquer história prévia de doenças cardiovasculares e apresentou os sintomas 1 h após a segunda dose ingerida. O ECG revelou taquicardia e prolongamento do intervalo QT, efeitos atribuídos à administração do suplemento alimentar (94).

Desta forma, e pelos casos clínicos relatados, sai reforçada a ideia de existir uma toxicidade cardíaca da sinefrina, em especial quando usada em associação com outros estimulantes cardíacos.

1.5.2) A sinefrina e o stress oxidativo

Os radicais livres são espécies reactivas que possuem um ou mais electrões desemparelhados. Essas espécies, muitas vezes, são essenciais para respostas biológicas, como por exemplo, a indução da morte celular programada, a detecção de alterações na tensão de oxigénio, o controlo da adesão celular, a regulação do tónus vascular e outras funções regulatórias (95). Porém, em certas situações, o aumento na produção de espécies reactivas pode resultar em situações deletérias para o organismo (96). Esses fenómenos nefastos, caracterizados por um desequilíbrio entre a produção de espécies reactivas e os sistemas de defesa antioxidantes do organismo, são denominados genericamente por stress oxidativo.

Os sistemas de defesa antioxidante envolvem mecanismos preventivos e de reparação de situações de stress oxidativo e englobam: agentes não enzimáticos, proteínas com funções protectoras, proteínas que minimizam a disponibilidade de metais envolvidos na génese do stress oxidativo e sistemas enzimáticos (96).

Entre os agentes não enzimáticos antioxidantes, o tripeptídeo γ -glutamilcisteinilglicina ou glutathione reduzida (GSH) é considerado o principal regulador da homeostase redox intracelular (95). Este tripeptídeo de baixo peso molecular actua como co-factor de diversas enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos e com papéis antioxidantes, como por exemplo a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione-S-transferase (GST); participa no transporte de aminoácidos através da membrana plasmática; tem função regeneradora de antioxidantes como as vitaminas C e E e possui capacidade captadora directa de radicais livres, nomeadamente radicais hidroxilo ($\text{HO}\bullet$) e superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (95, 96). Outros compostos antioxidantes endógenos incluem o tocoferol ou vitamina E [que actua como captador de radicais peroxilo, inibindo assim a peroxidação lipídica (96)], o ácido ascórbico ou vitamina C [agente reductor que actua neutralizando espécies reactivas e regenerando pequenas moléculas antioxidantes como o α -tocoferol, GSH e β -caroteno (96, 97)], a tioredoxina [molécula endógena amplamente distribuída que, na sua forma reduzida, possui dois grupos sulfidrílo ($-\text{SH}$) que podem ser convertidos em sulfureto em situações de stress oxidativo (96)]. Em vários estudos, podem usar-se como suplementos antioxidantes a N-acetil-cisteína (NAC) [que interage directamente com espécies reactivas como H_2O_2 e $\text{HO}\bullet$ e também pode estimular a síntese de GSH já que é uma fonte de $-\text{SH}$ (98)] e o 4,5-dihidroxi-1,3-benzeno ácido disulfónico (Tiron) [antioxidante permeável à membrana celular que mimetiza a acção da superóxido-dismutase (SOD) e é um captador de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (99)] .

As principais enzimas responsáveis pela destoxificação de espécies reactivas são a SOD, a GPx e a catalase (CAT) (Figura 5). A SOD catalisa a dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 e O_2 . Apesar de ser considerada uma primeira linha de defesa contra espécies reactivas de oxigénio (ROS), a SOD promove um aumento dos níveis de H_2O_2 . A acumulação desta espécie acarreta uma maior produção de $\text{OH}\bullet$ (com alta reactividade) via reacção de Fenton. Sendo assim, a CAT e a GPx representam um papel importante na transformação do H_2O_2 em água (95). A acção da CAT promove a redução do H_2O_2 em água. Como possui menor afinidade para o H_2O_2 do que a GPx, o seu papel é apenas relevante em condições em que se está em presença de altas concentrações de H_2O_2 (96). A GPx catalisa a redução de H_2O_2 através da oxidação da GSH para formar glutathione oxidada (GSSG) e água. A continuidade deste ciclo catalítico depende da posterior redução da GSSG pela glutathione redutase (GR), reacção que consome nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida (NADPH) formado pela via das pentoses (96).

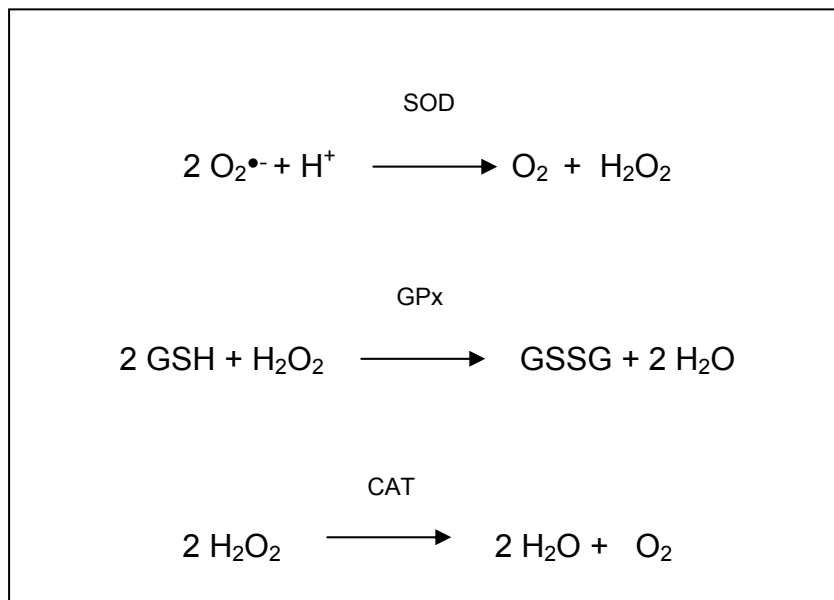


Figura 5) Principais enzimas envolvidas na destoxificação de espécies reactivas.

O coração é um órgão vulnerável ao stress oxidativo porque possui limitações nas suas defesas antioxidantes quando comparado com outros órgãos. A quantidade de GSH no fígado (cerca de 8 mM), por exemplo, em condições normais, é significativamente menor do que no coração (cerca de 2 mM) (96). As actividades da catalase CAT, da SOD e da GPx também são 150, 4 e 2 vezes menores no coração quando comparadas a sua actividade no fígado, respectivamente (96, 100).

Estudos demonstram que o stress oxidativo também contribui para patofisiologia, não mediada por receptores adrenérgicos, das catecolaminas (101-104). Acrescente-se que o stress oxidativo também contribui, directa ou indirectamente, para a toxicidade das anfetaminas e da efedrina (105-108). Como estas substâncias possuem estrutura química e comportamento farmacológico semelhante à sinefrina (Figura 4), é possível que também os efeitos tóxicos da sinefrina estejam relacionados com fenómenos de stress oxidativo.

Secção II)

OBJECTIVOS

OBJECTIVOS

Após a grande difusão da sinefrina no mercado dos suplementos alimentares, surgiram relatos de eventos cardíacos adversos atribuídos a este composto, o que, inclusivamente, motivou a proibição do uso da sinefrina em suplementos alimentares no Canadá (9). Os relatos de toxicidade directamente associados ao uso de sinefrina e a sua semelhança estrutural com a efedrina e demais compostos com conhecidos efeitos adversos cardiovasculares, justificam a preocupação relativo ao potencial cardiotoxico da sinefrina. Porém, embora bastante consumida, a literatura associada à avaliação da segurança da sinefrina evidencia lacunas graves (22). Além disso, os estudos *in vitro* com a sinefrina, importantes numa perspectiva mecanística, são praticamente inexistentes.

Sendo assim, esta dissertação teve como objectivo principal contribuir para a elucidação da cardiotoxicidade dos diferentes isómeros de sinefrina presentes em suplementos alimentares. Para atingir este objectivo, o trabalho experimental foi dividido em três fases, cada qual contemplando os seguintes objectivos específicos:

Fase I: Desenvolver e validar uma metodologia de análise que permita a quantificação simultânea de *p*- e *m*-sinefrina em matrizes celulares. De referir que a grande maioria dos métodos de análise actualmente disponíveis analisa matrizes vegetais, sendo praticamente inexistentes métodos que usem matrizes biológicas não vegetais.

Fase II: Avaliar a capacidade de entrada da *p*- e da *m*-sinefrina em cardiomiócitos tolerantes ao cálcio isolados de rato adulto, assim como os principais transportadores envolvidos neste mesmo transporte.

Fase III: Avaliar o potencial cardiotoxico de *p*- e *m*-sinefrina, nomeadamente através da determinação da viabilidade celular, dos níveis de glutathione total (GSHt), GSH e GSSG. Realizaram-se, igualmente, estudos com os antioxidantes NAC e Tiron em cardiomiócitos tolerantes ao cálcio isolados de rato adulto incubados com os dois isómeros da sinefrina.

Secção III)

SECÇÃO EXPERIMENTAL

SECÇÃO EXPERIMENTAL

III.1) Desenvolvimento da metodologia de análise

III.1.1) A selecção da matriz de estudo escolhida

Após revisão da literatura, pode constatar-se que, entre os métodos analíticos disponíveis para a sinefrina, a grande maioria destina-se a sua análise em matrizes vegetais (12, 14, 15, 50, 109-111) ou suplementos alimentares (2, 12, 16, 20, 72, 109-116). Considerando as matrizes biológicas de origem não vegetal, apenas existem alguns protocolos validados para quantificar a sinefrina em plasma e urina (1, 50, 117).

Uma vez que a presente dissertação teve como objectivo central a elucidação dos possíveis mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade e no transporte da sinefrina, a ausência de metodologias para quantificação deste analito em matrizes celulares determinou a necessidade de desenvolver e validar um método adequado. As matrizes celulares, tal qual a maioria das matrizes biológicas, são complexas devido à presença de inúmeros compostos endógenos.

A matriz biológica não vegetal seleccionada para o desenvolvimento da metodologia analítica para a determinação dos níveis de sinefrina foi a linha celular Caco-2. Este modelo é frequentemente utilizado para o estudo da absorção intestinal, excreção e metabolismo de xenobióticos (118-120). Embora os cardiomiócitos possuam características distintas das células Caco-2, a metodologia de validação exige uma quantidade de células que dificilmente seria obtida no processo de isolamento de cardiomiócitos tolerantes ao cálcio a partir de rato adulto. Assim, a validação da metodologia usando a linha celular em suspensão apresentou uma grande vantagem técnica. Além disso, as Caco-2 são ricas em transportadores que podem condicionar a absorção e excreção de xenobióticos (121, 122). Não menos importante, a matriz celular

Caco-2 permitiu mimetizar todos os procedimentos a que os cardiomiócitos seriam submetidos posteriormente.

Em conclusão, os procedimentos de validação da metodologia de análise foram realizados com suspensão de células Caco-2. Aliquotas de 1 mL de suspensão de Caco-2 ($2,5 \times 10^5$ células/mL) foram centrifugadas (18 *g* por 2 min). A matriz celular a analisar foi obtida após precipitação das proteínas com ácido perclórico a 5% do sedimento celular resultante da centrifugação anterior. Após centrifugação da suspensão ácida (16000 *g*, 10 min, 4°C), a *m*- e a *p*-sinefrina foram adicionadas ao sobrenadante, bem como 10 µL do padrão interno [solução de 4-hidroxi-3-metoxibenzilamina (250 µg/mL) preparada em metanol].

III.1.2) Técnica preparativa da amostra

As análises a matrizes complexas necessitam de processos prévios de purificação e concentração (123). Por isso, a extracção em fase sólida (SPE) configurou-se como uma técnica vantajosa para o tipo de matriz celular deste trabalho e tem sido amplamente usada no pré-tratamento de amostras. Trata-se de um método que possibilita a passagem de grande volume de matriz através da fase estacionária, que irá reter selectivamente os analitos de interesse. Os interferentes da matriz poderão ser então descartados e os analitos previamente retidos são eluídos com pequenas quantidades de solvente orgânico, produzindo um eluato mais límpido e praticamente livre de impurezas, o que aumenta a selectividade da análise instrumental (123). Outra vantagem do tratamento por SPE quando comparada à extracção líquido-líquido é que, além de permitir a purificação, essa técnica também pré-concentra o analito, aumentando a sensibilidade do método a utilizar (16). Por estes motivos, a SPE foi o método extractivo escolhido para as matrizes celulares utilizadas (cardiomiócitos e Caco-2).

III.2) Análise instrumental

III.2.1) Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

A cromatografia gasosa (GC) ainda é uma alternativa pouco explorada para a análise da sinefrina porque requer um passo adicional de derivatização das amostras, uma vez que a sinefrina é uma molécula com alta polaridade, baixa volatilidade e instabilidade térmica (19). As modificações estruturais proporcionadas pela derivatização, que consiste na substituição dos grupos polares, promovem ou melhoram a volatilidade e a estabilidade dos analitos e permitem uma análise mais selectiva. A reacção de derivatização escolhida para a sinefrina foi a acilação (Figura 6); uma técnica usada com sucesso em aminas primárias e secundárias e catalisada pelo calor (124). O reagente seleccionado para proceder a essa acilação foi o anidrido trifluoracético (ATFA), que foi incubado com o eluído da SPE previamente seco e com acetato de etilo sob aquecimento (80° C) por 20 min. Para evitar danos à coluna cromatográfica do GC, o excesso de ATFA foi eliminado sob fluxo de hélio e o produto da reacção foi re-suspenso em acetato de etilo para posterior análise instrumental por GC.

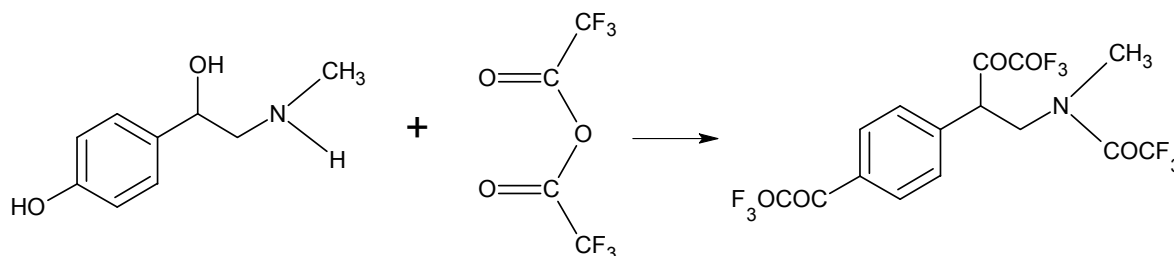


Figura 6) Reacção de derivatização da *p*- e *m*-sinefrina com ATFA (25).

Associado a um método de separação é necessário um detector que permita a identificação do analito. Nesse sentido, a hifenização de técnicas cromatográficas com a espectrometria de massa (MS) reduz significativamente o número de possibilidades estruturais, permitindo uma identificação com alto grau de confiança e especificidade (19, 25, 112).

O equipamento utilizado para a análise instrumental do derivatizado de sinefrina foi o GC/MS Varian CP-3800 GC (USA) equipado com um detector *ion trap* (VARIAN Saturn 4000, USA) operando em modo *full scan* com tempo máximo de ionização de 2500 μ s. A coluna cromatográfica utilizada foi a VF-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) da VARIAN. O injector foi ajustado a 250 °C e a temperatura inicial do forno foi de 100°C por 1 min seguido por uma rampa de temperatura de 15 °C/min até 300° C. O gás de arraste utilizado foi o hélio C-60 (Gasin, Portugal), com um fluxo constante de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 1 μ L no modo *split* com um rácio de 1:10. O detector foi ajustado para temperaturas de 280 °C na linha de transferência, 50 °C no coletor e 180 °C na captura de iões. Para a quantificação, é determinada a razão das áreas dos analitos e do padrão interno em modo *full scan*. Os iões qualificadores dos analitos foram: padrão interno m/z 69, m/z 232 e m/z 345; *p*- e *m*-sinefrina m/z 69, m/z 140 e m/z 455.

Os parâmetros avaliados para a validação do método foram: selectividade, linearidade, especificidade, precisão, exactidão, recuperação, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

III.3) Modelo experimental

Nesta dissertação, essencialmente no que se reporta ao segundo artigo, utilizou-se suspensões de cardiomiócitos tolerantes ao cálcio isolados de rato adulto para o estudo da potencial cardiotoxicidade da *m*- e *p*-sinefrina. Por ser um modelo *in vitro*, este envolve o sacrifício de menos animais comparativamente aos ensaios *in vivo*, visto que permite o estudo de mais condições por animal sacrificado. Além desta vantagem ética, os cardiomiócitos isolados fornecem dados mecanísticos relevantes ao permitirem ensaios num ambiente controlado e sem a influência de variáveis experimentais advindas da circulação vascular, do sistema nervoso ou hormonal (125).

Os cardiomiócitos recentemente isolados de rato adulto são células musculares cardíacas funcionais que se encontram totalmente diferenciadas, ao contrário das linhas celulares (126). Algumas linhas celulares, como a H9c2, têm características de células musculares (127) mas não têm as mesmas características morfológicas ou padrão de proteínas G, o que pode influenciar a resposta a xenobióticos (126, 127).

Uma característica importante das células isoladas de rato adulto usadas nesta dissertação é a sua tolerância a concentrações fisiológicas de cálcio, o que as torna mais

próximas dos cardiomiócitos encontrados no coração (128). Porém, os cardiomiócitos isolados de rato adulto oxidam preferencialmente a glicose, ao contrário do que acontece *in vivo*, onde os substratos de preferência do coração são os ácidos gordos (129).

A técnica de isolamento é baseada na retro-perfusão por via da artéria aorta do coração com solução tampão Krebs-Henseleit modificada (102 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 10 mM glucose, 5,5 mM NaHCO₃, 0,9 mM KH₂PO₄ e 22 mM HEPES, pH=7,2-7,4) e livre de cálcio, seguida da perfusão com uma solução enzimática contendo uma mistura de collagenases (colagenase tipo II, Worthington®, Lakewood e colagenase tipo IA, Sigma-Aldrich®, Saint Louis) em solução Krebs-Henseleit com 200 µM de cálcio. Após a digestão enzimática e remoção do coração do sistema de perfusão, o órgão sofre uma digestão mecânica que permitirá a desagregação das células isoladas. Após filtração (por filtro de 350 mesh) para remoção dos pedaços não digeridos, a suspensão obtida é centrifugada (300 *g* por 2 min) e lavada 3 vezes com solução Krebs-Henseleit com 0,6 e 1 mM de cálcio para remoção de quantidades residuais de enzima e células menos densas (células mortas e células endoteliais) (102, 130-132). Nesta metodologia, os níveis de cálcio são reintroduzidos aos poucos até uma concentração final de 1 mM, que é considerada a concentração de cálcio extracelular fisiológica no coração. Antes da incubação dos vários compostos a estudar, as células tiveram um período de 30 min de pré-incubação.

A obtenção de cardiomiócitos resistentes ao cálcio em concentrações fisiológicas requer técnicas elaboradas para preservar o glicocálix, promover a estabilização das junções estreitas e prevenir o excesso da entrada de sódio nos cardiomiócitos (128). No final do isolamento, a viabilidade é determinada pela avaliação microscópica da morfologia das células isoladas (células em formato rectangular ou *rod shaped*) e através de ensaio de libertação de lactato-desidrogenase (LDH). Os ensaios utilizados tiveram viabilidade sempre maior que 60% pelo ensaio da libertação da LDH e foram realizados utilizando uma densidade de 2,5 x 10⁵ células/mL. Esta viabilidade está de acordo com os valores previamente descritos em isolamentos de cardiomiócitos utilizando esta técnica (101-103, 128, 131, 132). As células foram incubadas a 37 °C e oxigenadas com corrente de carbogénio humificado de hora em hora.

A viabilidade celular, os níveis de glutathione e a actividade de enzimas como a GR, GPx e GST mantêm-se estáveis até 4 h nos cardiomiócitos incubados a 37 °C (128), o que é essencial para as avaliações pretendidas nesta dissertação. Para permitir que estas determinações sejam realizadas sem interferências, utilizaram-se meios de isolamento e

incubação livres de antioxidantes, aminoácidos, hormonas e albumina (128). A utilização de meios simples que não interferem com a capacidade enzimática das células e na capacidade de oxidação das moléculas testadas é essencial para os parâmetros avaliados nesta dissertação.

Em conclusão, as suspensões de cardiomiócitos isolados através desta metodologia têm sido utilizadas na avaliação da cardiotoxicidade de vários compostos (101, 102, 104, 128, 131, 133), sendo consideradas um bom modelo *in vitro* para tais estudos. Além disso, estas células são um modelo adequado para o estudo do transporte mediado por transportadores de catiões iónicos (OCTs) uma vez que estes transportadores se encontram funcionais nos cardiomiócitos (132). Estas células foram escolhidas considerando os relatos de toxicidade cardiovascular associados ao uso da sinefrina no emagrecimento (9, 11, 84, 89, 90) e por serem um método robusto para avaliar efeitos cardíacos *in vitro*.

III.3.2) Concentração utilizada

Como anteriormente referido nesta dissertação, frequentemente há diferenças significativas entre os teores de sinefrina declarados e o conteúdo efectivo da sinefrina nos suplementos alimentares (72, 112, 113). Porém, a maioria destes produtos contém cerca de 10 a 40 mg de sinefrina por dose recomendada diária (17). Após o consumo de 5,5; 21 e 46,8 mg de sinefrina, as concentrações plasmáticas máximas em humanos foram cerca de 1,6; 10,5 e 17 nM de sinefrina, respectivamente (11, 51). Já as concentrações plasmáticas de sinefrina enquanto amina biogénica variam desde 0,1 a 10 nM em condições fisiológicas (24), embora já tenham sido descritas concentrações até 103 nM em indivíduos em crise de enxaqueca (23). No entanto, considerando os valores intersticiais das aminas biogénicas, as concentrações tecidulares de sinefrina podem ser cerca de 10 vezes maiores do que as plasmáticas (24).

Nos trabalhos apresentados nesta dissertação, a concentração utilizada de *p*- e *m*-sinefrina foi de 1 mM. Neste caso, concentrações na ordem dos mM justificam-se devido ao emprego de estudos *in vitro* com tempos de incubação muito curtos (tempo máximo de 3 h).

Manuscrito I:

Development and validation of a GC/IT-MS method for simultaneous quantitation of *para*- and *meta*-synephrine in biological samples

Reproduzido a partir de *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*

Copyright © 2010 com permissão da Elsevier



Development and validation of a GC/IT-MS method for simultaneous quantitation of *para* and *meta*-synephrine in biological samples

Luciana Grazziotin Rossato*, Paula Guedes de Pinho, Renata Silva, Helena Carmo, Félix Carvalho, Maria de Lourdes Bastos, Vera Marisa Costa, Fernando Remião*

REQUIMTE, Toxicology Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Aníbal Cunha 164, 4099-030 Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 December 2009

Received in revised form 12 February 2010

Accepted 16 February 2010

Available online 23 February 2010

Keywords:

Gas chromatography–ion trap mass spectrometry (GC/IT-MS)

Citrus aurantium

Synephrine

Caco-2

Cardiomyocytes

ABSTRACT

After the FDA's ban of ephedrine-containing supplements, *Citrus aurantium* appeared as an alternative to ephedra in herbal weight loss products. Synephrine, the most abundant active component of *C. aurantium*, exists in three different structural or positional isomeric forms (*ortho*–*o*–, *meta*–*m*–, and *para*–*p*–). Dietary supplements contain *m*- and *p*-synephrine, both α -adrenergic agonists, while the *m*-isoform is the most potent at α_1 -adrenoreceptors. In spite of the pharmacokinetic and toxicological interest in the study of these compounds, adequate methods for their quantification in biological samples are yet to be developed. Thus, in the present study, a sensitive gas chromatography–ion trap mass spectrometry (GC/IT-MS) method was developed and validated for the simultaneous quantitation of *m*- and *p*-synephrine in a cellular matrix after solid phase extraction (SPE). The validation of the method was performed through the evaluation of the following parameters: selectivity, linearity, specificity, precision, accuracy, limit of detection, limit of quantification, and recovery. The method's applicability was studied in two different biological matrices by evaluating *p*- and *m*-synephrine uptake in Caco-2 cells and also in freshly isolated cardiomyocytes from adult rat. The developed GC/IT-MS method was shown to be selective, accurate, precise, and valid for simultaneous determination of *p*- and *m*-synephrine in biological samples.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Synephrine is an alkaloid, present in *Citrus aurantium*, which has been frequently included in dietary supplements, mainly after the ban of ephedrine in weight loss products, by the Food and Drug Administration (FDA) [1,2].

Synephrine is an adrenergic agonist, and can exist in three different positional isomeric forms (*ortho*–*o*–, *meta*–*m*–, or *para*–*p*–) (Fig. 1) with nonequivalent pharmacological properties. *o*-Synephrine is not used as a pharmaceutical agent and its presence in nature has not been documented [3]. Furthermore, it is well

known that *p*- and *m*-synephrine, also named phenylephrine, are trace endogenous amines widely distributed among bacteria, invertebrates, and vertebrates, including humans [4]. Although there are some studies that report the presence of *m*-synephrine in *C. aurantium* [5–7], the majority of works report that only *p*-synephrine can be found in plants [4,8,9]. Nevertheless, when considering weight loss products, the presence of *m*-synephrine is also reported, probably due to synthetic addition [10,11].

The use of synephrine or synephrine-containing extracts in dietary supplements is attributed to β_3 receptors stimulation, which could help to reduce fat mass through lipolysis stimulation, increase of metabolic rate, and promotion of fat oxidation with increase of thermogenesis [12]. However, synephrine is also an unspecific adrenergic agonist and several adverse effects, mainly cardiovascular effects, have been associated to the use of synephrine-containing products [13–16]. Importantly, the synephrine's pharmacokinetic and toxicokinetic data are still very scarce, which is probably due to the lack of methodologies adapted common use laboratory equipment [17]. Indeed, until now, only liquid chromatography–mass spectrometry (LC/MS) [18,19] and radioactivity methodologies [20] have been applied in synephrine's pharmacokinetic studies.

Thus, the main aim of the present study was to develop and validate a sensitive gas chromatography–ion trap mass spectrom-

Abbreviations: *p*-synephrine, *para*-synephrine; *m*-synephrine, *meta*-synephrine; FDA, Food and Drug Administration; LC/MS, liquid chromatography–mass spectrometry; GC/IT-MS, gas chromatography–ion trap mass spectrometry; DMEM, Dulbecco's modified eagle's medium with 4500 mg/L glucose; NEAA, nonessential amino acids (GlutMAX™); FBS, fetal bovine serum; IS, internal standard; TFAA, trifluoroacetic anhydride; EMEA, European Medicines Agency; DMSO, dimethyl sulfoxide; HEPES, *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N*-(2-ethanesulfonic acid); SPE, solid phase extraction; LOQ, limit of quantification; LOD, limit of detection; LDH, lactate dehydrogenase; CV, coefficient variation.

* Corresponding authors. Tel.: +351 222078979.

E-mail addresses: luciana@gratto.com.br (L.G. Rossato), remiao@ff.up.pt (F. Remião).

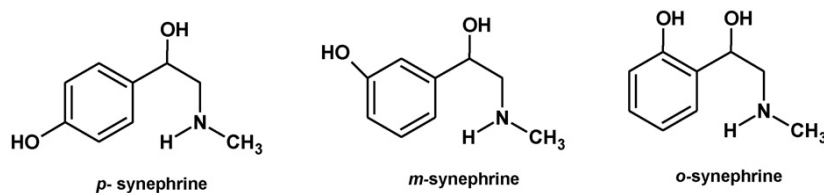


Fig. 1. Chemical structures of syneprhine positional isomers.

etry (GC/IT-MS) method for simultaneous determination of *p*- and *m*-syneprhine. The present methodology was further applied to evaluate the syneprhine's uptake in an immortalized cell line of heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma cells (Caco-2 cells) and in freshly isolated cardiomyocytes from adult rat.

The Caco-2 cell line is one of the most widely used human cell culture models and has been largely accepted as a reliable *in vitro* model for the rapid screening of intestinal drug absorption and excretion in humans [21–23]. In addition, since cardiovascular events have been associated with syneprhine-containing products, the *m*-syneprhine uptake in freshly isolated cardiomyocytes was evaluated since this positional isomer has been reported to be the most potent adrenergic agonist of syneprhine [24]. This cellular model was already used to evaluate the uptake of catecholamines and its related compounds in previous studies [25–27].

The present method could be helpful to evaluate the physiologic levels of syneprhine as a biogenic amine and its pharmacokinetic profile.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

All chemicals and reagents were of analytical grade. Trifluoroacetic anhydride (99%) (TFAA), (\pm) *p*-syneprhine ($\geq 98\%$), (–) *m*-syneprhine hydrochloride, 4-hydroxy-3-methoxybenzylamine hydrochloride, collagenase (type IA), and *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N*-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES) were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Collagenase type II was obtained from Worthington (Lakewood, NJ). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and perchloric acid (HClO₄) were purchased to Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Biological matrices

Dulbecco's modified eagle's medium with 4500 mg/L glucose (DMEM) and GlutMAX™, nonessential amino acids (NEAA), fetal bovine serum (FBS), trypsin (0.25%)–EDTA (1 mM), antibiotic (10,000 U/mL penicillin, 10,000 µg/mL streptomycin), fungizone (anphotericin B 250 µg/mL) and human transferrin (4 mg/mL) were obtained from Gibco Laboratories (Lenexa, KS). AccuGENE® (1× PBS buffer) was obtained from Lonza Laboratories (Verviers, Belgium).

Caco-2 cells were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere using DMEM medium supplemented with 10% FBS, 1% antibiotic, 1% fungizone, 1% NEAA, and transferrin 6 µg/mL.

The validation of the method was performed using Caco-2 cells as matrix. Aliquots of 1 mL Caco-2 cell suspensions (2.5×10^5 cells/mL) were centrifuged (18 × *g* for 2 min) and cellular matrix was obtained after precipitation of the produced pellet with 5% HClO₄. After a centrifugation (16,000 × *g*, 10 min, 4 °C), the supernatant was used as the matrix where *p*- and *m*-syneprhine were added.

Adult male Sprague–Dawley rats (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) weighing 250–350 g were used for cardiomyocyte isolation. Calcium-tolerant cardiomyocytes were isolated by Langendorff retro perfusion of adult rat heart, as previously described [25,26]. At the beginning of the experiments, cell viability was always greater than 60%, as evaluated by the lactate dehydrogenase (LDH) leakage assay and by the microscopic evaluation of the cardiomyocyte's morphology. Incubations were performed in a water bath at 37 °C, using a density of 2.5×10^5 cells/mL in modified Krebs–Henseleit buffer supplemented with 1 mM CaCl₂ (pH 7.4) and saturated, every hour, with an airstream of carbogen.

2.3. Calibrators and quality control samples

Stock solutions of *m*-syneprhine and *p*-syneprhine (150 µg/mL), as well as all intermediate solutions, were prepared in 5% HClO₄. Syneprhine standards were prepared by adding intermediate solutions to the acidic supernatant of Caco-2 cells, in order to achieve the final concentrations of 10, 100, 500, 1000, 5000, and 10,000 ng/mL. Samples with intermediary concentrations (250, 2500, and 7000 ng/mL) were prepared in order to evaluate accuracy. Internal standard (IS) stock solution of 4-hydroxy-3-methoxy-benzylamine (1 mg/mL) was prepared in methanol. Ten microliters of IS solution (250 µg/mL) was added to each sample.

2.4. Sample preparation for GC/IT-MS analysis

2.4.1. Solid phase extraction (SPE)

All samples (blank, standards, and cellular matrices) were extracted using Waters OASIS SPE columns. The totality of sample was passed through the column, after which 2 mL of HCl 0.1N and 2 mL methanol were applied. Finally, the compounds of interest (both syneprhine positional isomers and the IS) were eluted to a glass tube using 2 mL of a methanol solution with 5% NH₄OH. The obtained solution was dried under nitrogen flow. To eliminate residual water, all tubes were left open in the excicator overnight.

2.4.2. Derivatization procedure

Dried residues were submitted to derivatization with 50 µL ethyl acetate and 50 µL TFAA. The incubation was performed at 80 °C for 20 min. After cooling to room temperature, the solution was dried under nitrogen flow. The obtained residue was dissolved in 100 µL of ethyl acetate and injected into the GC/IT-MS system.

2.5. Analytical instrument settings

GC/IT-MS analysis was performed with a Varian CP-3800 GC (USA) equipped with a VARIAN Saturn 4000 ion trap mass detector (USA) and a Saturn GC/MS workstation software version 6.8. The GC was equipped with a VF-5ms (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) from VARIAN. The carrier gas was Helium C-60 (Gasin, Portugal), at a constant flow of 1 mL/min in split mode 1:10. One microliter of the derivatized standard or of the cellular extract was injected. The injector port was heated to 250 °C. The initial column temperature of 100 °C was held for 1 min, followed by temperature ramp of

15°C/min to 300°C, with a 10 min post-run hold. Total separation run time was 9 min. The ion trap detector was set as follows: the transfer line, manifold, and trap temperatures were 280, 50, and 180°C, respectively. All mass spectra were acquired in the electron impact mode. Ionization was maintained off during the first 3:50 min, to avoid solvent overloading. The mass range was 50–600 *m/z*, with a scan rate of 6 scan/s. The emission current was 50 μ A, and the electron multiplier was set in relative mode to autotune procedure. The maximum ionization time was 25,000 μ s, with an ionization storage level of 35 *m/z*. The analysis was performed in full scan mode. The selected qualifier ions were: IS *m/z* 69, *m/z* 232, and *m/z* 345; *p*- and *m*-synephrine *m/z* 69, *m/z* 140, and *m/z* 455.

2.6. Method validation

2.6.1. Evaluation of selectivity

Blank samples (5% HClO₄) and cellular matrix control samples were extracted by SPE, derivatized, and analysed by GC/IT-MS to detect possible interferences from endogenous components or experimental procedures. Chromatographic selectivity was evaluated by the presence or absence of co-eluting peaks at the retention times of the analytes or IS. First of all, IS was also tested alone, under the same conditions, in order to evaluate possible interferences of other compounds.

2.6.2. Linearity

Linearity, as indicated by the evaluation of regression curves and squared correlation coefficients (*r*²), was performed in 3 days using 6 different concentration levels of the analytes. All standards of *m*-synephrine and *p*-synephrine were extracted in the presence of IS by SPE, before derivatization. The linear range of the method was investigated by performing calibration curves in the concentration range of 10 ng/mL to 10 μ g/mL (10, 100, 500, 1000, 5000, and 10,000 ng/mL) and the minimal accepted *r*² for the two synephrine positional isomers was of 0.99.

2.6.3. Limits of detection and quantification

The limit of detection and quantification (LOD and LOQ, respectively) were determined from calibration curves data, following European Medicines Agency (EMA) criteria [28]. The LOQ was defined as the lowest concentration of the calibration curve and it was estimated after 5 injections based on a signal-to-noise ratio of 10. A signal-to-noise ratio of 3 was considered acceptable for estimating the LOD [28].

2.6.4. Precision and accuracy

Intra-day precision was determined by preparing and analyzing by GC/IT-MS, on the same day, 5 replicates of 3 different concentrations (100, 1000, and 10,000 ng/mL) of *m*- and *p*-synephrine. Inter-day precision was evaluated by repeating the intra-day precision study in 3 different days. Precision was assessed by calculating the mean, standard deviation, and coefficient of variation (CV%) of those values.

Accuracy was determined by evaluating a low, a medium, and a high concentration of *m*- and *p*-synephrine (250, 2500, and 7000 ng/mL) and through the calculation of the percentual deviation between the calculated value and the nominal value.

2.6.5. Extraction recovery

Recovery for synephrine positional isomers through SPE was assessed by adding the IS to samples of *m*- and *p*-synephrine at low, medium, and high concentrations (100, 1000, and 10,000 ng/mL). IS was added to one set of samples before the extraction procedure and to another set after extraction, but before solvent evaporation. Each concentration of both sets was analysed in 3 replicates. The

percentage of recovery was calculated by comparing the peak area ratios of the analyte to IS for these two set conditions.

2.6.6. Specificity

Solutions containing structurally related substances, namely biogenic amines or substances that could be co-ingested with synephrine as dietary supplements impurities or adulterants were evaluated in the specificity study. The possibility of interference by dopamine, adrenaline, octopamine, ephedrine, caffeine, and by the metabolites *m*-hydroxymandelic acid and *p*-hydroxymandelic acid were analysed by evaluating the presence or absence of interfering peaks at the retention times of the analytes. Solutions containing 1000 ng/mL of each substance were prepared and analysed.

2.6.7. Sample storage/stability

Short-term stability was evaluated using aliquots of low, medium, and high concentrations of *m*- and *p*-synephrine (100, 1000, and 10,000 ng/mL) prepared in 5% HClO₄. One set of samples was kept at room temperature, another set was kept at 4°C and the last set was stored at –20°C. After 3 days, all samples were analysed by GC/IT-MS in 3 replicates.

2.7. Proof of applicability

2.7.1. Study of synephrine uptake by Caco-2 cells

The Caco-2 cell model was used to predict the potential intestinal absorption of synephrine. The Caco-2 cells were sub-cultured at 90% confluence with trypsin (0.25%)–EDTA (1 mM) and seeded into 24-well plates at a density of 60,000 cells/cm² to obtain confluent monolayers at the day of the experiment. On the day of the experiment, cells were washed with PBS buffer (pH 7.4), and then incubated at 37°C for 3 h with *p*- or *m*-synephrine (500 μ M and 1 mM each). Each group had 3 replicates and was tested in 3 different and independent experiments. DMSO (1%) was required to prepare *p*-synephrine solutions. Thus, one group of cells was exposed only to DMSO (1% final concentration).

After 3 h incubation, the medium was aspirated and cells were lysed with 5% HClO₄ and centrifuged (16,000 \times g, 10 min, 4°C). The IS was added to the obtained supernatants and samples were prepared as referred in Section 2.4 to be analysed by GC/IT-MS.

2.7.2. Study of synephrine uptake by isolated cardiomyocytes

The validated method was also applied to another cellular matrix, calcium-tolerant freshly isolated cardiomyocytes from adult rat, to study synephrine uptake by these cells. After a pre-incubation period of 30 min, the cell suspensions were exposed to *m*-synephrine (1 mM). After 3 h incubation, aliquots of cell suspensions were centrifuged (18 \times g for 2 min), the supernatant discarded, and cells were lysed with 5% HClO₄, and centrifuged (16,000 \times g, 10 min, 4°C). The IS was added to supernatant and samples were analysed by GC/IT-MS.

2.7.3. Viability evaluation and protein determination

The protocol used for the LDH leakage assay in Caco-2 cells was performed as already described [29].

In the cardiomyocyte suspensions, the percentage of rod-shaped cells and the LDH leakage assay were determined as previously described [30–32]. In order to confirm the sampling homogeneity, the protein levels were determined by the method described by Lowry [33].

2.8. Statistical analysis

Results are presented as means \pm the standard deviation (SD) (*n* = 9 per condition out of 3 independent experiments). Nonpara-

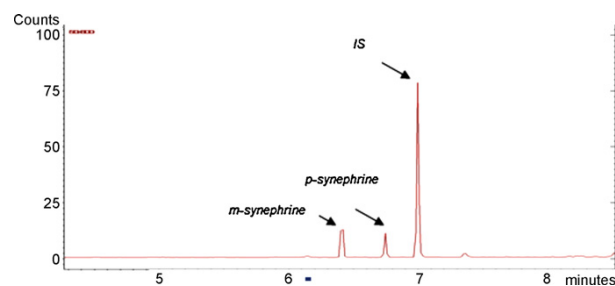


Fig. 2. Representative separations of *m*-syneprhine (500 ng/mL), *p*-syneprhine (500 ng/mL), and IS (4-hydroxy-3-methoxy-benzylamine) in Caco-2 cells by GC/IT-MS (full scan).

metric tests were used. Kruskal–Wallis test (one-way ANOVA on ranks) was used to compare means of different treatment groups, followed by the Student–Newman–Keuls *post hoc* test, if a significant *p*-value had been obtained. Statistical significance was accepted at *p*-values less than 0.05.

3. Results

3.1. Method validation

3.1.1. SPE extraction, GC/IT-MS separation, and selectivity

The SPE was able to purify and pre-concentrate the analytes. Fig. 2 shows a full scan of a chromatogram of a Caco-2 cells extract, with the retention times of 6.18 and 6.52 min for *m*- and *p*-syneprhine, respectively. The IS retention time was 7.0 min and the total time of the analysis was 9 min. It was possible to obtain a good resolution of the peaks and no interference peaks were observed at the retention times of the analytes and of the IS.

The *m/z* ions of the two syneprhine positional isomers analysed were the same, with the ions *m/z* 69, *m/z* 140, and *m/z* 455. The mass spectrum of the IS was *m/z* 69, *m/z* 232, and *m/z* 345.

3.1.2. Linearity, LOD, and LOQ

The method was considered linear at the concentration range between 10 ng/mL and 10 µg/mL. Linear regression analysis was determined with correlation coefficients (r^2) greater than 0.99 for the calibration curves of both syneprhine positional isomers standards. The results for linearity are presented in Table 1.

Table 1

Linear regression analysis from *m*- and *p*-syneprhine in a Caco-2 cells matrix performed in 3 different days using 6 levels of concentration.

Analyte	Day	Equation	Range (ng/mL)	r^2
<i>p</i> -syneprhine	Day 1	$y = 0.0005x - 0.0185$	10–10,000	0.999
	Day 2	$y = 0.0004x$	10–10,000	0.998
	Day 3	$y = 0.0004x + 0.0308$	10–10,000	0.999
<i>m</i> -syneprhine	Day 1	$y = 0.0004x$	10–10,000	0.999
	Day 2	$y = 0.0003x + 0.014$	10–10,000	0.998
	Day 3	$y = 0.0004x + 0.0243$	10–10,000	0.999

Table 2

Precision, accuracy and recovery from *m* and *p*-syneprhine in Caco-2 cells by GC/IT-MS.

Analyte	Concentration (ng/mL)	Intra-day (<i>n</i> = 5)	Inter-day (<i>n</i> = 5)	Recovery (<i>n</i> = 3)	Accuracy (<i>n</i> = 3)	
		Precision (%)	Precision (%)	(%)	Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
<i>m</i> -syneprhine	100	2.9	10.1	81.1	250	98.2
	1000	7.3	2.1	90.1	2500	110.9
	10,000	4.5	7.2	96.8	7000	115.1
<i>p</i> -syneprhine	100	7.5	4.6	79.1	250	95.0
	1000	7.2	10.2	90.6	2500	115.8
	10,000	2.8	8.6	95.7	7000	103.9

The LOQ and LOD were estimated following EMEA criteria [28] and were 10 and 3 ng/mL, respectively.

3.1.3. Precision, accuracy, and recovery

Precision, accuracy, and recovery results are summarized in Table 2. Results of intra- and inter-day precision showed CV% values not exceeding 15%, which mean that the method is precise [34].

As the calculated values of accuracy were always within 15% of the nominal value, the method could be considered accurate [34].

Recoveries varied between 79.1% and 95.1% for *p*-syneprhine and between 81.1% and 96.8% for *m*-syneprhine.

3.1.4. Specificity

Biogenic amines (dopamine and adrenaline), syneprhine biotransformation products (*m*-hydroxymandelic acid and *p*-hydroxymandelic acid) and caffeine, which is the stimulant mostly associated with syneprhine in weight loss products, do not react with the derivatization reagent used and could not be analysed by this method. Octopamine, a biogenic amine also present in *C. aurantium* fruits, ephedrine, and amphetamine, exhibited retention times of 6.8, 5.7, and 4.7 min respectively, thus, do not interfering with syneprhine and IS.

3.1.5. Stability

Short-term stability of syneprhine solutions in 5% HClO₄, when stored at room temperature, 4 or –20 °C, was evaluated. The best syneprhine storage condition, for at least 3 days, was to keep the samples at 4 °C. The other conditions presented chromatograms with smaller analyte' peaks when compared with fresh solutions of the same concentration. Additional peaks from possible degradation products were not observed in none of the conditions evaluated.

3.2. Determination of intracellular syneprhine content in Caco-2 cells

Both positional isomers *p*- and *m*-syneprhine (1 mM and 500 µM) and DMSO (1%) were not cytotoxic after 3 h incubation (data not shown).

In 3 independent experiments and after a 3 h incubation with 1 mM of each syneprhine isomer, the intracellular contents of *m*- and *p*-syneprhine were 25.55 ± 5.6 and 26.1 ± 10.5 µM, respec-

tively. When Caco-2 cells were exposed to smaller concentrations, the intracellular content detected significantly decreased ($p < 0.05$). When cells were incubated with 500 μM *m*-synephrine for 3 h, the intracellular content was $12.0 \pm 4.18 \mu\text{M}$, while with 500 μM *p*-synephrine the intracellular concentration was $11.6 \pm 4.3 \mu\text{M}$. In *m*-synephrine groups, a residual quantity of *p*-synephrine was detected. The *p*-synephrine content in *m*-synephrine groups was $312 \pm 0.20 \text{ nM}$ (*m*-synephrine 500 μM) and $240 \pm 0.03 \text{ nM}$ (*m*-synephrine 1 mM). *m*-Synephrine was not detected in either of the *p*-synephrine groups.

No interfering peaks in the chromatogram were found in control group or vehicle group (data not shown).

3.3. Determination of intracellular synephrine content in cardiomyocytes

No significant differences in viability were observed between treatments in LDH leakage assay after 3 h incubation with *m*-synephrine (data not shown).

In 3 independent experiments, the cardiomyocyte suspensions was exposed to 1 mM of *m*-synephrine and the detected intracellular concentration was about $4.72 \pm 0.8 \mu\text{M}$.

4. Discussion

The proposed GC/IT-MS method was successfully developed and validated (Fig. 2, Tables 1 and 2). It was linear in a large range of concentration with low LOD and LOQ (3 and 10 ng/mL, respectively). Curiously, the recovery results presented better results for the higher concentrations used when compared with the medium and low levels (Table 2). Moreover, the present method is able to quantify both isomers showing no interferences from cellular matrix. The biogenic amines generally present in biological samples, namely adrenaline, dopamine, and octopamine, or possible adulterants or compounds present in weight loss products, such as caffeine, ephedrine, and amphetamine [4,35] did not interfere with synephrine's analysis.

The literature reports on the chemical analysis of synephrine commonly refer the use of liquid chromatography coupled to ultraviolet detection (HPLC/UV) and most of them are applied to herbal products, fruits, or leaves of *Citrus* sp. [3,9,36]. Furthermore, UV detection presents several interferences, since dietary supplements and vegetable biological samples are very complex matrices. These limitations can be overcome by the use of mass detection. There are two reports using LC/MS and LC/MS/MS analysis to detect and quantify synephrine in biological samples, namely urine, aqueous humor, serum, and plasma [18,19]. However, the proposed GC/IT-MS method presents better recovery results. Furthermore, SPE presents some advantages when compared with liquid extraction, which is non-selective, time-consuming, requires the utilization of huge amounts of organic solvents, and it is an approach that may allow the formation of emulsions. These limitations are important especially when applied to complex matrices such as biological samples.

There is a notorious lack of studies with synephrine in biological samples other than vegetables, urine, and plasma matrices. Regarding synephrine analysis, GC/IT-MS represents a good potential to be exploited since there are only two methods described using this approach and none of those using cellular matrices [8,37]. The GC methods previously published are applied to dietary supplements and they show linearity range, LOD, and LOQ to concentrations higher than those required for biological analysis [8,37]. Furthermore, in the work of Andrade et al., samples must be subjected to a maceration process of 60–90 min and the derivatization procedure with cyclohexanone lasts 1 h [8]; thus it

is a time-consuming method. To the best of our knowledge, this is the first time that a sensitive method to quantify simultaneously both synephrine isomers by GC/IT-MS, in a cellular matrix, is described.

Considering the high polarity and low volatility of synephrine, a derivatization step is required for GC/MS analysis [8]. The reaction with TFAA was successfully employed in the present work, minimizing matrix interferences. The validated GC conditions have resulted in well resolved peaks, in which the synephrine positional isomers and the IS have different retention times (Fig. 2). Furthermore, the complete runs last less than 9 min, which also represents an advantage for this methodology. Different peaks other than the synephrine or IS were not identified and were attributed to endogenous substances.

Although there is no consensus about the presence of *m*-synephrine in *Citrus* sp., it is important that analytical protocols are able to identify simultaneously *p*- and *m*-synephrine considering that it is well known that dietary supplements contain both synephrines [5,6,10,11].

The method developed in the present study can help to understand synephrine behaviour in *in vitro* or *in vivo* models and to predict and clarify its pharmacokinetic profile. *In vitro* studies with synephrine are nearly nonexistent. Although *in vitro* studies have extrapolation limitations, they provide important insights and new mechanistic data, namely when considering toxicology and pharmacokinetics. Moreover, as the present method is able to analyse both synephrine positional isomers, it could also help to clarify whether *m*-synephrine is actually present in nature. Considering that the lack of sensitive methods for the detection of trace amines as synephrine, in biological samples, has limited their investigation [38], the present methodology can be applied even to elucidate synephrine's physiological role.

Through the present study, it was possible to observe that the uptake of *p*- or *m*-synephrine by Caco-2 cells, after 3 h, was around 2.5%. The detected intracellular concentrations were about 26 and 12 μM for both positional isomers when exposed to concentrations of 1 and 0.5 mM, respectively. To the best of our knowledge, it was the first time that a study concerning synephrine Caco-2 uptake is described. We showed that, although *m*-synephrine is more potent when concerning the activation of adrenergic receptors [24], when it comes to the uptake transport, both synephrine positional isomers have the same ability to enter Caco-2 cells, as highlighted by the similar intracellular concentrations detected for *m*- and *p*-synephrine.

In the Caco-2 cells study, a residual quantity of *p*-synephrine was detected in cells exposed to *m*-synephrine. This intriguing result could not be explained by the occurrence of impurities in the *m*-synephrine added since the same was not observed in standard curves, which were constructed from the same origin. In fact, only chiral inversion of synephrine has already been reported *in vivo* [39] or when samples are extracted with high temperatures and for long periods of refluxing [40]. Our samples were not subjected to drastic chemical conditions, thus this positional conversion may be related to the high enzymatic competency of Caco-2 cells [41], although it was never described before.

Cardiomyocytes were chosen as an alternative model to show the applicability of the method to matrices other than Caco-2 cells because of the important cardiovascular adverse effects related to synephrine. In fact, these cardiotoxic effects determined the prohibition of dietary supplements containing synephrine in Canada [13–16]. Through the present methodology, it was possible to detect and quantify *m*-synephrine in freshly isolated Ca^{2+} tolerant cardiomyocytes from the adult rat.

5. Conclusion

The proposed GC/IT-MS method can be regarded as selective, accurate, precise, and valid for simultaneous determination of *m*- and *p*-synephrine with a total running time of 9 min. Through this method it was possible to evaluate, for the first time, the uptake of both isomers in Caco-2 cells and of *m*-synephrine in freshly isolated cardiomyocytes.

Acknowledgments

Caco-2 cells were kindly provided by Dr^a Rosário Monteiro, Biochemistry Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Portugal.

This work received financial support from the Portuguese State through “Fundação para a Ciência e Tecnologia” (FCT) (project PPCDT/SAU-OBS/55849/2004).

References

- [1] N.C. Bouchard, M.A. Howland, H.A. Greller, R.S. Hoffman, L.S. Nelson, Ischemic stroke associated with use of an “ephedra-free” dietary supplement containing synephrine, *Mayo Clin. Proc.* 80 (2005) 541–545.
- [2] J.T. Dwyer, D.B. Allison, P.M. Coates, Dietary supplements in weight reduction, *J. Am. Diet. Assoc.* 105 (2005) S80–S86.
- [3] J. Santana, K.E. Sharpless, B.C. Nelson, Determination of *p*-synephrine and *m*-synephrine positional isomers in Bitter Orange-containing supplements by LC/UV and LC/MS/MS, *Food Chem.* 109 (2008) 675–682.
- [4] A. Fugh-Berman, A. Myers, *Citrus aurantium*, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research, *Exp. Biol. Med.* 229 (2004) 698–704.
- [5] S. Haaz, K.R. Fontaine, G. Cutter, N. Limdi, S. Perumean-Chaney, D.B. Allison, *Citrus aurantium* and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update, *Obes. Rev.* 7 (2006) 79–88.
- [6] S. Bent, A. Padula, J. Neuhaus, Safety and efficacy of *Citrus aurantium* for weight loss, *Am. J. Cardiol.* 94 (2004) 1359–1361.
- [7] S.R. Penzak, M.W. Jann, J.A. Cold, Y.Y. Hon, H.D. Desal, B.J. Gurley, Seville orange juice: synephrine content and cardiovascular effects in normotensive adults, *J. Clin. Pharmacol.* 41 (2001) 1059–1063.
- [8] A.S. Andrade, G.C. Schmitt, L.G. Rossato, D. Russowsky, R.P. Limberger, Gas chromatographic method for analysis of *p*-synephrine in *Citrus aurantium* L. products, *Chromatographia* (2009) S225–S229.
- [9] M.D. Arbo, E.R. Larentis, V.M. Linck, A.L. Aboy, A.L. Pimentel, A.T. Henriques, E. Dallegre, S.C. Garcia, M.B. Leal, R.P. Limberger, Concentrations of *p*-synephrine in fruits and leaves of *Citrus* species (Rutaceae) and the acute toxicity testing of *Citrus aurantium* extract and *p*-synephrine, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 2770–2775.
- [10] D.B. Allison, G. Cutter, E.T. Poehlman, D.R. Moore, S. Barnes, Exactly which synephrine alkaloids does *Citrus aurantium* (Bitter Orange) contain? *Int. J. Obes.* 29 (2005) 443–446.
- [11] F. Greenway, L. Jonge-Levin, C. Martin, A. Roberts, I. Grundy, C. Parker, Dietary herbal supplements with phenylephrine for weight loss, *J. Med. Food* 9 (2006) 572–578.
- [12] C. Carpené, J. Galitzky, E. Fontana, C. Atgüé, M. Lafontan, M. Berlan, Selective activation of beta3-adrenoceptors by octopamine: comparative studies in mammalian fat cells, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 359 (1999) 310–321.
- [13] S. Jordan, M. Murty, K. Pilon, Products containing bitter orange or synephrine: suspected cardiovascular adverse reactions, *Can. Med. Assoc. J.* 171 (2004) 993–994.
- [14] C.A. Haller, N.L. Benowitz, P. Jacob, Hemodynamic effects of ephedra-free weight-loss supplements in humans, *Am. J. Med.* 118 (2005) 998–1003.
- [15] D.L. Nykamp, M.N. Fackih, A.L. Compton, Possible association of acute lateral-wall myocardial infarction and bitter orange supplement, *Ann. Pharmacother.* 38 (2004) 812–816.
- [16] L.T. Bui, D.T. Nguyen, P.J. Ambrose, Blood pressure and heart rate effects following a single dose of bitter orange, *Ann. Pharmacother.* 40 (2006) 53–57.
- [17] G. D'Andrea, G.P. Nordera, F. Perini, G. Allais, F. Granella, Biochemistry of neuromodulation in primary headaches: focus on anomalies of tyrosine metabolism, *Pharmacol. Pathophysiol. Neuromodulation* 28 (2007) S94–S96.
- [18] S. Barnes, J.K. Prasain, C.C. Wang, D.R. Moore II, Applications of LC/MS in the study of the uptake, distribution, metabolism and excretion of bioactive polyphenols from dietary supplements, *Life Sci.* 78 (2006) 2054–2059.
- [19] J. Beyer, F. Peters, T. Kraemer, H.H. Maurer, Detection and validated quantification of nine herbal phenalkylamines and methcathinone in human blood plasma by LC–MS/MS with electrospray ionization, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 150–160.
- [20] J.H. Hengstmann, H. Aulepp, Pharmacokinetics and metabolism of 3H-synephrine, *Arzneimittelforschung* 28 (1978) 2326–2631.
- [21] P. Anderle, E. Niederer, W. Rubas, C. Hilgendorf, H. Spahn-Langguth, H. Wunderli-Allenspach, H.P. Merkle, P. Langguth, P-Glycoprotein (P-gp) mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: the influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 757–762.
- [22] S. Yamashita, K. Konishi, Y. Yamazaki, Y. Taki, T. Sakane, H. Sasaki, Y. Furuyama, New and better protocols for a short-term Caco-2 cell culture system, *J. Pharm. Sci.* 91 (2002) 669–679.
- [23] C. Huynh-Delerme, H. Huet, L. Noel, A. Frigieri, M. Kolf-Clauw, Increased functional expression of P-glycoprotein in Caco-2 TC7 cells exposed long-term to cadmium, *Toxicol. In Vitro* 19 (2005) 439–447.
- [24] C.M. Brown, J.C. McGrath, J.M. Midgley, A.G. Muir, J.W. O'Brien, C.M. Thonoor, C.M. Williams, V.G. Wilson, Activities of octopamine and synephrine stereoisomers on alpha-adrenoceptors, *Br. J. Pharmacol.* 93 (1988) 417–429.
- [25] F. Remião, H. Carmo, F. Carvalho, M.L. Bastos, The study of oxidative stress in freshly isolated Ca²⁺ tolerant cardiomyocytes from the adult rat, *Toxicol. In Vitro* 15 (2001) 283–287.
- [26] F. Remião, M. Carvalho, H. Carmo, F. Carvalho, M.L. Bastos, Cu²⁺ induced isoproterenol oxidation into isoprenochrome in adult rat calcium-tolerant cardiomyocytes, *Chem. Res. Toxicol.* 15 (2002).
- [27] V.M. Costa, M.L. Ferreira, P.S. Branco, F. Carvalho, M.L. Bastos, R.A. Carvalho, M. Carvalho, F. Remião, Cross-functioning between the extraneuronal monoamine transporter and multidrug resistance protein 1 in the uptake of adrenaline and export of 5-(glutathion-S-yl)adrenaline in rat cardiomyocytes, *Chem. Res. Toxicol.* 22 (2009) 129–135.
- [28] EMEA, Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, CPMP/ICH/ 381, 1995, pp. 1–15.
- [29] J.P. Capela, E. Fernandes, F. Remião, M.L. Bastos, A. Meisel, F. Carvalho, Ecstasy induces apoptosis via 5-HT_{2A} receptor stimulation in cortical neurons, *Neurotoxicology* 28 (2007) 868–875.
- [30] F. Remião, H. Carmo, F. Carvalho, M.L. Bastos, Copper enhances isoproterenol toxicity in isolated rat cardiomyocytes, *Cardiovasc. Toxicol.* (2001).
- [31] F. Remião, D. Rettori, D. Han, F. Carvalho, M.L. Bastos, E. Cadenas, Leucoisoprenochrome-o-semiquinone formation in freshly isolated adult rat cardiomyocytes, *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2004) 1584–1590.
- [32] V.M. Costa, R. Silva, M.L. Ferreira, P.S. Branco, F. Carvalho, M.L. Bastos, R.A. Carvalho, M. Carvalho, F. Remião, Oxidation process of adrenaline in freshly isolated rat cardiomyocytes: formation of adrenochrome, quinoproteins and GSH adduct, *Chem. Res. Toxicol.* 20 (2007) 1183–1191.
- [33] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–272.
- [34] FDA, Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry, May 2001.
- [35] H.M. Blanck, M.K. Serdula, C. Gillespie, D.A. Galuska, P.A. Sharpe, J.M. Conway, L.K. Khan, B.E. Ainsworth, Use of nonprescription dietary supplements for weight loss is common among Americans, *J. Am. Diet. Assoc.* (2007) 441–447.
- [36] F. Pellati, S. Benvenuti, Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of phenethylamine alkaloids in *Citrus aurantium*, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 71–88.
- [37] E. Marchei, S. Pichini, R. Pacifici, M. Pellegrini, P. Zuccaro, A rapid and simple procedure for determination of synephrine in dietary supplements by gas-chromatography-mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1468–1472.
- [38] G. D'Andrea, S. Terrazzino, A. Leon, D. Fortin, F. Perini, F. Granella, G. Bussone, Elevated levels of circulating trace amines in primary headaches, *Neurology* 62 (2004) 1701–1705.
- [39] F. Kusu, K. Matsumoto, K. Arai, K. Takamura, Determination of synephrine enantiomers in food and conjugated synephrine in urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Anal. Biochem.* 235 (1996) 191–194.
- [40] F. Pellati, S. Benvenuti, M. Melegari, Enantioselective LC analysis of synephrine in natural products on a protein-based chiral stationary phase, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 839–849.
- [41] S. Siissalo, L. Laine, A. Tolonen, A.M. Kaukonen, M. Finel, J. Hirvonen, Caco-2 cell monolayers as a tool to study simultaneous phase II metabolism and metabolite efflux of indomethacin, paracetamol and 1-naphthol, *Int. J. Pharm.* 383 (1–2) (2009) 24–29.

Manuscrito II:

Structural isomerization of synephrine influences its uptake and ensuing glutathione depletion in rat isolated cardiomyocytes

Artigo submetido

1 **TITLE: Structural isomerization of synephrine influences its uptake and**
2 **ensuing glutathione depletion in rat isolated cardiomyocytes**

3 **AUTHORS**

4 Luciana Grazziotin Rossato*, Vera Marisa Costa, Paula Guedes de Pinho, Félix
5 Carvalho, Maria de Lourdes Bastos, and Fernando Remião*

6

7 **AFFILIATION**

8 REQUIMTE, Toxicology Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua
9 Aníbal Cunha 164, 4099-030 Porto, Portugal

10

11 * **Corresponding Authors:** Luciana Grazziotin Rossato (E-mail:
12 luciana@gratto.com.br) and Fernando Remião (E-mail: remiao@ff.up.pt)

13 REQUIMTE, Departamento de Toxicologia

14 Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164

15 4099-030 Porto, Portugal

16 Phone: 00351-222078979

17

18 **RUNNING TITLE: Synephrine: mediated-transport and glutathione depletion**

19

20

21

22 **ABREVIATIONS:**

23 CORT – corticosterone

24 DMSO – dimethyl sulfoxide

25 DTNB – 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)

26 GC/IT-MS – gas chromatography ion trap-mass spectrometry

27 GR – glutathione reductase

28 GSH – reduced glutathione

29 GSht – total glutathione

30 GSSG – glutathione disulfide

31 HClO₄ – perchloric acid

32 HEPES – *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N*-(2-ethanesulfonic acid)

33 IS – internal standard

34 LDH – lactate dehydrogenase

35 MRP1 – multidrug resistance protein 1

36 NAC – N-acetyl-cysteine

37 NADPH – reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

38 OCT – organic cation transporter

39 OCTN – novel organic cation transporter

40 PMAT – plasma membrane monoamine transporter

41 QUIN – quinidine

42 ROS – reactive oxygen species

43 SD – standard deviation

44 SPE – solid phase extraction

- 45 TFAA – trifluoroacetic anhydride
- 46 Tiron – 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic acid
- 47 β -NADH – reduced β -nicotinamide adenine dinucleotide
- 48

50 **ABSTRACT:**

51 Synephrine is a natural compound, frequently added to ephedra-free dietary
52 supplements for weight-loss, due to its effects as a nonspecific adrenergic agonist.
53 Though only *p*-synephrine has been documented in plants, the presence of *m*-
54 synephrine has also been reported in weight-loss products. The crescent use of
55 synephrine in dietary supplements was accompanied by reports of adverse effects,
56 especially at the cardiovascular level.

57 The present work aimed to study the role of organic cation mediated transport of *m*-
58 and *p*-synephrine and the possibility that *p*- and *m*-synephrine induce intracellular
59 changes in glutathione levels in calcium-tolerant freshly isolated cardiomyocytes from
60 adult rat. After a 3 h incubation with 1 mM *p*- or *m*-synephrine, the intracellular
61 content of synephrine was measured by gas chromatography/ion trap-mass
62 spectrometry (GC/IT-MS); cell viability and intracellular glutathione levels were also
63 determined. To evaluate the potential protective effects of antioxidants against the
64 adverse effects elicited by *m*-synephrine, cells were pre-incubated for 30 min with
65 Tiron (100 μ M) or N-acetyl-cysteine (NAC) (1mM). To assess the influence of α_1 -
66 adrenoceptors activation in glutathione depletion, a study with prazosin (100 nM) was
67 also performed.

68 The results obtained provide evidence that organic cation transporters (OCT) OCT3
69 and OCT1 seem to play a major role in *m*- and *p*-synephrine-mediated transport into
70 the cardiomyocytes. The importance of these transporters seems similar for both
71 isomers, although *p*-synephrine enters more into the cardiomyocytes. Furthermore,
72 only *m*-synephrine induced intracellular total glutathione (GSht) and reduced
73 glutathione (GSH) depletion. NAC and Tiron were able to counteract the *m*-
74 synephrine-induced GSH and GSht decrease. On the other hand, the incubation with
75 prazosin was not able to change *m*-synephrine-induced glutathione depletion showing
76 that this effect is independent of α_1 -adrenoceptor stimulation. In conclusion, both
77 positional isomers require OCT3 and OCT1-mediated transport to enter into the
78 cardiomyocytes, however, the hydroxyl group in the *p*- position favors the OCT
79 mediated transport into cardiomyocytes. Furthermore, the structural isomerization of
80 synephrine influences its toxicological profile once only *m*-synephrine caused GSH
81 depletion.

82 **Keywords:** Synephrine, rat cardiomyocytes, cardiac adverse effects, organic cation
83 transporter; glutathione depletion.

84

85

86 1. INTRODUCTION

87 Synephrine is an unspecific adrenergic agonist, which can exist in three different
88 positional isomers (*ortho o*-, *para p*-, and *meta m*-) (1). *o*-Synephrine has not been
89 detected in weight-loss products. Some authors state that, as only *p*-synephrine can
90 be found in nature (2-4), *m*-synephrine is not expected to be present in the so-called
91 “natural” dietary supplements. However, the presence of *m*-synephrine in weight-loss
92 products has already been described (5, 6). The *m*- isoform, also named
93 phenylephrine, is considered the most potent synephrine’s adrenergic agonist at α_1 -
94 adrenoceptors, when compared to the other positional isomers (7).

95 Synephrine is an adrenergic stimulant and it is thought to promote weight loss
96 through stimulation of β_3 -adrenoceptors, through the increase of fat metabolism rate
97 (8). The scientific interest towards synephrine increased after the Food and Drug
98 Administration (FDA) prohibition of ephedra-containing weight-loss products.
99 Synephrine emerged as an adequate alternative to ephedrine and soon became one
100 of the most common stimulant present in dietary products (9). However, as with
101 ephedrine, important adverse effects associated to synephrine’s consumption in
102 weight-loss products have been reported, mainly at the cardiovascular level. These
103 reports include hypertension, tachyarrhythmia, variant angina, cardiac arrest, QT
104 prolongation, ventricular fibrillation, and even acute lateral-wall myocardial infarction
105 (10-14). These side effects have already determined the prohibition of synephrine-
106 containing dietary supplements in Canada (15).

107 Structurally, synephrine is similar to ephedrine, amphetamines, adrenaline, and
108 noradrenaline (Figure 1). Studies indicate that oxidative stress contributes, directly or
109 indirectly, to the cardiotoxicity of amphetamines and ephedrine (16, 17). Furthermore,
110 the cardiotoxicity of catecholamines has also been extensively associated with the
111 imbalance of cardiac antioxidant defences (18-23). Therefore, it is possible that the
112 cardiotoxic effects of synephrine can also be related to the decrease of cardiac
113 antioxidants.

114 Recently, we described the entrance of *m*-synephrine into rat cardiomyocytes (24).
115 However, to the best of our knowledge, no study has been made to determine the
116 mechanism of synephrine transport into the heart or isolated cardiomyocytes.
117 Multispecific organic transporters are responsible for the carrier-mediated transport of

118 a wide range of cationic xenobiotics through cellular membranes. The mediated-
119 transport of cations includes several types of transporters, namely the organic cation
120 transporter family (OCT), which includes OCT1, OCT2, and OCT3; and the novel
121 organic cation transporter family (OCTN), which includes the transporters responsible
122 for carnitine uptake OCTN1, OCTN2, and OCTN3 (25-28). OCT3 is widely distributed,
123 being strongly expressed in the heart. OCT1 is also expressed in human and rodent
124 hearts (29). When regarding to the OCTN family, only OCTN1 was described in
125 human and rat cardiomyocytes (25-28). Synephrine is a weak base and it is well
126 known that organic cations, resulting from being positively charged at physiological
127 pH, are the main substrates translocated by OCTs through the cellular membranes
128 (29).

129 In this work, we aimed to investigate the contribution of organic cation transporters
130 in synephrine's entry into rat cardiomyocytes and its relation to synephrine's cardiac
131 adverse effects (25). We have recently shown that freshly isolated calcium tolerant
132 cardiomyocytes from adult rat are a suitable model for the study of catecholamine
133 transport (30). In addition, to elucidate the potential adverse effects at cardiac level of
134 *p*- and *m*-synephrine, the effects upon cell viability, and the levels of total glutathione
135 (GSht), reduced glutathione (GSH), and glutathione disulfide (GSSG) were
136 determined. Moreover, the possible protective effects of the antioxidants N-acetyl-
137 cysteine (NAC), 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic acid (Tiron) and the
138 contribution of α_1 -adrenoceptor activation in synephrine-induced adverse effects were
139 also investigated.

140

141

142 **2. MATERIAL and METHODS**

143 **2.1. Animals**

144 Adult male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain)
145 weighing 250-350 g were used. The animals were housed in cages, with a
146 temperature-and humidity-controlled environment. Food and water were provided *ad*
147 *libitum* and animals were subjected to a 12 h light-dark cycle. Animal experiments
148 were licensed by Portuguese General Directory of Veterinary Medicine. Housing and
149 experimental treatment of the animals were in accordance with the Guide for the Care
150 and Use of Laboratory Animals from the Institute for Laboratory Research (ILAR
151 1996). The experiments complied with current Portuguese laws.

152

153 **2.2. Chemicals**

154 All chemicals and reagents were of analytical grade. Trifluoroacetic anhydride
155 (TFAA), (\pm) *p*-syneprine, (-) *m*-syneprine hydrochloride, 4-hydroxy-3-
156 methoxybenzylamine hydrochloride, collagenase (type IA), *N*-(2-hydroxyethyl)
157 piperazine-*N*-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), quinidine hydrochloride (QUIN), Tiron,
158 NAC, corticosterone (CORT), prazosin, GSH, GSSG, glutathione reductase (GR, EC
159 1.6.4.2), 2-vinylpyridine, reduced β -nicotinamide adenine dinucleotide (β -NADH), and
160 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) were obtained from Sigma-Aldrich (St.
161 Louis, MO). Collagenase type II was obtained from Worthington (Lakewood, NJ).
162 Dimethyl sulfoxide (DMSO) and perchloric acid (HClO₄) were obtained from Merck
163 (Darmstadt, Germany).

164

165 **2.3. Calcium tolerant cardiomyocytes isolated from adult rat**

166 Calcium-tolerant cardiomyocytes were isolated by Langendorff retro perfusion of
167 adult rat heart, as previously described (18, 22, 23, 30). The procedure was based on
168 successive treatments with calcium free medium and digestion with collagenases
169 (collagenase type II and collagenase type IA in 200 μ M calcium-modified Krebs-
170 Henseleit buffer solution), followed by a gentle mechanical disaggregation. Calcium
171 levels were gradually re-introduced until a final concentration of 1 mM in order to

172 obtain calcium tolerant cardiomyocytes. At the beginning of the experiments, cell
173 viability was always greater than 60%, through evaluation of cardiomyocyte
174 morphology in the optical microscope and by the lactate dehydrogenase (LDH)
175 leakage assay. The obtained viability is in accordance with previous reports for
176 calcium tolerant cardiomyocytes (18, 22, 23, 30, 31). Incubations were performed in a
177 water bath at 37 °C, using a density of 2.5×10^5 viable cells/mL in modified Krebs-
178 Henseleit buffer supplemented with 1 mM CaCl_2 (pH 7.4) and saturated with an air
179 stream of carbogen (95% O_2 / 5% CO_2), every hour.

180 After a preincubation of 30 min at 37 °C, the cardiomyocytes were then incubated
181 with the different compounds, namely *p*- and *m*-syneprine (1 mM); the OCT3
182 inhibitor CORT (100 μM); the OCT1 inhibitor QUIN (100 μM); the α_1 -adrenoceptor
183 antagonist prazosin (100 nM); and the antioxidants NAC (1 mM) and Tiron (1 mM).

184

185 **2.4. Cell viability assays**

186

187 **2.4.1. Morphology**

188 The percentage of rod-shaped cells was determined using a Neubauer chamber,
189 as previously described (20). Cell with a length/width ratio of > 4 were considered rod-
190 shaped cells.

191

192 **2.4.2. LDH leakage Assay**

193 The LDH leakage assay was directly performed to evaluate the level of cell injury
194 at time zero (immediately after addition of the compounds) and after the 3 h
195 incubation in all groups (18, 32).

196

197 **2.5. Sample treatment**

198 After the 3 h incubation period, cell samples were obtained after centrifugation of
199 cardiomyocyte suspensions, at 18g, for 2 min. The pellet was washed 3 times with
200 modified Krebs-Henseleit buffer supplemented with 1 mM CaCl_2 , centrifuged at 18g
201 for 2 min, and finally treated according to the different determinations. Washing
202 solutions, obtained after centrifugation, were discarded (18, 30).

203

204 **2.6. GC-MS analysis**

205 After the 3 h incubation period with 1 mM *p*- or *m*-syneprine, the intracellular
206 content of each syneprine isomer was determined by gas chromatography-ion trap
207 mass spectrometry (GC/IT-MS), as previously described (24). Cardiomyocyte

suspensions were treated as described in the section 2.5., lysed with 5% HClO₄ and centrifuged (16000g, 10 min, 4 °C). The supernatants obtained were used to evaluate the synephrine's internalization in the cardiomyocytes. Before a solid phase extraction (SPE) step, all samples were spiked with 10 µL of internal standard (IS) 4-hydroxi-3-methoxybenzylamine hydrochloride and analysed by GC/IT-MS, as previously described (24).

Quantitative measurements of intracellular *p*- and *m*-synephrine content were carried out by interpolation in the standard curves obtained by injection of standard solutions of both isomers. A new standard curve was prepared each day that the analysis was carried out.

p-Synephrine was dissolved in DMSO. When analysing *p*-synephrine, a group of cells was only incubated with the vehicle (DMSO 1%) in order to guarantee the absence of interfering peaks in the retention times of analytes or IS.

221

2.6.1. Evaluation of the role of OCT3 and OCT1 in synephrine's transport into the cardiomyocytes

To evaluate the role of OCT3 in the entrance of *p*- and *m*-synephrine into cardiomyocytes, the classical and specific inhibitor CORT was employed. We used 100 µM of CORT since this concentration is described as specific for OCT3 in rat cardiomyocytes (30, 33). QUIN (100 µM) is described as an OCT1 inhibitor (30) and was used in order to test the influence of this carrier in synephrine-mediated transport into freshly isolated cardiomyocytes.

Cardiomyocytes were exposed to *p*- or *m*-synephrine (1 mM) in the presence or absence of CORT or QUIN. The tested inhibitors were pre-incubated for 30 min before the addition of the synephrine isomers to the cardiomyocyte suspensions.

Samples were analysed by GC/IT-MS after precipitation with 5% HClO₄, as described in GC/IT-MS analysis section. Control cells with no treatment and cells exposed to inhibitors alone were analysed in parallel in order to guarantee the absence of interfering peaks in the retention times of analytes or IS.

237

2.7. Measurement of GSht, GSH, and GSSG levels

The intracellular levels of GSH and GSSG in cardiomyocytes were evaluated by the DTNB-GSSG reductase recycling assay, as previously described (18). After a 3h incubation period, aliquots of cell suspensions were handled as described above. The obtained cardiomyocytes were lysed with 5% HClO₄. After centrifugation (16000g, 10min, 4°C), the supernatant obtained was used for the determination of GSht, GSH,

244 and GSSG in all groups. For this biochemical determination the cells were divided
245 into 4 different groups: i) control cells, with no treatment; ii) cells incubated with
246 synephrine alone; iii) cells pre-incubated for 30 min with the reactive oxygen species
247 (ROS) scavenger (Tiron or NAC) plus synephrine; and (iv) ROS scavenger alone (23,
248 34, 35). These determinations were made for both synephrine isomers,
249 independently. DMSO (1%) was required to prepare *p*-synephrine solutions. Thus,
250 one group of cells was exposed only to DMSO (1%) when *p*-synephrine was tested.
251 Furthermore, to evaluate if the generation of ROS was related with α_1 -adrenoceptors
252 activation, independent experiments were performed only with *m*-synephrine.
253 Cardiomyocytes were pre-incubated for 30 min with the α_1 - antagonist prazosin (100
254 nM) (23, 36), followed by the incubation with *m*-synephrine (1mM).

255

256 **2.8. Protein determination**

257 The protein levels were determined as previously described by Lowry (37).

258

259 **2.9. Statistical analysis**

260 Results are presented as means \pm the standard deviation (SD) from independent
261 experiments with cell suspensions obtained from different rats. Non-parametric tests
262 were used. Statistical comparisons between groups were performed with Kruskal-
263 Wallis test (one-way ANOVA on ranks) followed by the Student-Newman-Keuls *post*
264 *hoc* test, once a significant *p* had been obtained.

265 When only two treatment groups were compared, the Mann-Whitney Rank Sum
266 test was used. Details of the statistical analysis are described in each figure legend.
267 Significance was accepted at *p* values <0.05.

268

3. RESULTS

3.1. Incubation with 1 mM of *m*- or *p*-synephrine leads to different intracellular concentrations

As can it be seen in Figure 2, there are significant differences between the intracellular levels of each synephrine isomer. When cardiomyocytes were incubated with 1 mM *m*- or *p*-synephrine for 3 h, the intracellular content of *p*-synephrine was significantly higher (3.3 ± 1.9 μ M/mg of protein) when compared with *m*-synephrine levels (1.6 ± 1.1 μ M/mg of protein) (Figure 2).

3.2. Inhibition of OCT3 and OCT1 leads to the decrease in the intracellular content of *m*-synephrine

The intracellular content of *m*-synephrine was significantly reduced by the pre-incubation, for 30 min, with the OCT3 inhibitor, CORT (100 μ M) ($53.7\% \pm 13.9$) and with OCT1 inhibitor, QUIN (100 μ M) ($54.7\% \pm 37.0$) when compared with the *m*-synephrine group (Figure 3). These data indicate that both OCTs present in cardiomyocytes isolated from adult rat are involved in the mediated-transport of *m*-synephrine.

In order to guarantee the selectivity of CORT at 100 μ M, we also performed experiments with 1 μ M and 10 μ M of CORT. There were no differences in the magnitude of inhibition of *m*-synephrine's entrance into cardiomyocytes at any of the tested CORT concentrations (data no shown). QUIN, at 100 μ M, does not inhibit OCT3 (30).

DMSO (1%) was required to prepare CORT solutions. No interfering peaks in the chromatogram for *m*-synephrine evaluation were found in control groups, CORT, QUIN, or vehicle group (DMSO) (data not shown).

3.3. Inhibition of OCT3 and OCT1 leads to the decrease in intracellular content of *p*-synephrine

The intracellular levels of *p*-synephrine were also significantly reduced by the pre-incubation, for 30 min, with CORT ($26.3\% \pm 21.8$) and QUIN ($20.4\% \pm 26.2$) (Figure 4). Similarly to what happened with the *m*-isoform, both OCT1 and OCT3 have an important role in the mediated-transport of *p*-synephrine into cardiomyocytes.

303 DMSO (1%) was required to prepare CORT and *p*-synephrine solutions. No
304 interfering peaks in the chromatogram for *p*-synephrine evaluation were found in
305 control groups, CORT, QUIN, or vehicle group (DMSO) (data not shown).

306

307 **3.4. Only *m*-synephrine elicits alteration in the glutathione status**

308 In Figure 5, the levels of GSht in cardiomyocytes after a 3 h incubation period in
309 control ($13.7 \pm 2.1 \mu\text{M}/0.25 \times 10^6$ cardiomyocytes), vehicle (DMSO) (12.2 ± 2.5
310 $\mu\text{M}/0.25 \times 10^6$ cardiomyocytes), and 1 mM *p*-synephrine groups (12.4 ± 1.4
311 $\mu\text{M}/0.25 \times 10^6$ cardiomyocytes) can be observed. There are no statistical differences
312 between groups.

313 When cells were incubated with 1 mM of *m*-synephrine, a significant difference can
314 be observed in GSht and GSH levels when compared with control group, as shown in
315 Figure 6. The GSht and GSH depletion induced by *m*-synephrine in cardiomyocytes
316 were counteracted by the presence of the antioxidants Tiron (100 μM) [Figure 6 A)
317 and B)] and NAC (1 mM) [Figure 6 C) and D)]. Cardiomyocytes incubation with Tiron,
318 a superoxide scavenger, led to the intracellular increase in GSH at 3 h in the *m*-
319 synephrine plus Tiron group ($8.40 \pm 3.12 \mu\text{M GSH}/0.25 \times 10^6$ cardiomyocytes) when
320 compared with only *m*-synephrine treated cells ($5.8 \pm 2.4 \mu\text{M GSH}/0.25 \times 10^6$
321 cardiomyocytes) (Figure 6 B). The GSH values in the Tiron + *m*-synephrine group,
322 were similar to those found in the control group at 3h ($10.8 \pm 2.9 \mu\text{M GSH}/0.25 \times 10^6$
323 cardiomyocytes) (Figure 6 B). The same tendency occurred in the GSht values
324 (Figure 6 A). These results show that the pre-incubation with Tiron was able to
325 prevent the alterations in glutathione status observed in *m*-synephrine groups.
326 Regarding NAC + *m*-synephrine group, the intracellular levels of GSH were
327 significantly higher in this group ($7.6 \pm 1.6 \mu\text{M GSH}/0.25 \times 10^6$ cardiomyocytes) when
328 compared to *m*-synephrine group ($5.1 \pm 1.9 \mu\text{M GSH}/0.25 \times 10^6$ cardiomyocytes)
329 (Figure 6 D). In fact, the GSH values of NAC + *m*-synephrine group were similar to
330 those of the control group after 3 h incubation ($8.52 \pm 1.3 \mu\text{M GSH}/0.25 \times 10^6$
331 cardiomyocytes). The GSht levels between groups show the same tendency. No
332 significant differences were observed in the intracellular levels of GSht and GSH in
333 cardiomyocytes incubated with Tiron and NAC alone when compared with the control
334 groups (Figure 6).

335 Moreover, the GSht and GSH decrease promoted by *m*-synephrine was shown to
336 be independent from α_1 -adrenoceptors stimulation, since pre-incubation with prazosin
337 (100 nM) did not prevent or counteracted the decreases observed in GSht and GSH
338 intracellular levels of *m*-synephrine group (N=3) (data not shown).

339 No significant changes were observed in GSSG intracellular levels in any of the
340 tested groups (data not shown).

341

342 **3.5. Cellular viability**

343 During the 3h incubation period, none of the treatments caused changes in cell
344 viability when compared to control, as verified by the LDH leakage assay (data not
345 shown).

346

4. DISCUSSION

The major findings of this work highlighted the role of OCT3- and OCT1-mediated transport of synephrine into freshly isolated cardiomyocytes from adult rat and suggest that glutathione depletion may play a major role in *m*-synephrine-induced cardiac adverse effects.

In our previous study, it was shown, for the first time, the ability of *m*-synephrine to be transported into cardiomyocytes (24). In the present work, we not only confirmed the *m*-synephrine internalization in the cardiomyocytes but also of the *p*-synephrine's (Figure 2). Thus, we tried to elucidate the mechanisms involved in the transport of both synephrine's positional isomers used for weight-loss purposes. The results obtained showed that *m*-synephrine is transported by OCT3 and OCT1 into cardiomyocytes, as highlighted by lower *m*-synephrine intracellular levels detected when cells were pre-incubated, for 30 min, with OCT3 and OCT1 inhibitors, CORT and QUIN, respectively (Figure 3). Furthermore, no differences were observed in the amount of inhibition obtained with CORT or QUIN, hence OCT3 and OCT1 have similar importance in the entrance of this particular isomer. In the same way, *p*-synephrine is also transported into cardiomyocytes by OCT3 and OCT1 once similar lower *p*-synephrine intracellular levels were detected in the presence of CORT and QUIN (Figure 4).

The substrate and inhibitor specificities of OCTs and OCTNs overlap extensively (29). Although CORT shows dissimilar affinity and selectivity to the transporters of different animal species (38), CORT, at the employed concentration (100 μ M), is widely described in the literature as a specific and selective inhibitor of OCT3 in rat isolated cardiomyocytes (30, 33). QUIN could be considered an unspecific inhibitor, once it has already been described as an inhibitor of OCT1 (39), OCTN2 (40), and of the plasma membrane monoamine transporter (PMAT) (41). The OCTN family is responsible for carnitine uptake. Heart muscle is highly dependent on active carnitine uptake from the blood (26). However, only OCTN1 is described in rat and human cardiomyocytes (25-28). PMAT is also able to transport organic cations and despite its mRNA description in the heart (41, 42), to the best of our knowledge, the presence of its protein in cardiomyocytes has never been reported. Moreover, we already demonstrated that QUIN (100 μ M) does not inhibit OCT3 in calcium-tolerant cardiomyocytes freshly isolated from adult rat (30). Thus, we can assume that QUIN (100 μ M) inhibits only OCT1 transport in this cellular model.

382 The involvement of OCT3 in the uptake of adrenaline is well known (30), and
383 taking into account the structural similarities between the chemical structures of
384 synephrine and adrenaline (Figure 1), it is possible to postulate that the side chain is
385 of outmost relevance for the OCT3-mediated transport into the cardiomyocytes. On
386 the other hand, OCT1 is not related to the transport of adrenaline in cardiomyocytes
387 (30), suggesting that the presence of a single hydroxyl group in the aromatic ring
388 probably favours the OCT1-mediated transport. Interestingly, starting from the same
389 initial concentration of both positional isomers (1 mM), the intracellular levels detected
390 in cardiomyocytes after 3 h incubation were significantly higher for *p*-synephrine when
391 compared with *m*-synephrine (Figure 2). This result suggests that OCT3 and OCT1
392 share similarities for their substrates, but the hydroxyl group in the *p*- position favors
393 the OCT mediated transport into cardiomyocytes.

394 Although the incubation with *p*-synephrine results in significantly higher
395 intracellular level of this isomer in the cardiomyocytes than those obtained with the
396 same concentration of the *m*- isoform (Figure 2), *p*-synephrine did not promote any
397 significant changes in the intracellular glutathione levels (Figure 5). This highlights
398 that the structural isomerization influences the toxicological profile of synephrine. This
399 result can in fact corroborate the low or negligible cardiotoxicity of *p*-synephrine (4,
400 43, 44). Even using the same elevated concentration of *p*-synephrine (1 mM), which
401 is justified by our short-term study, lower intracellular levels of synephrine were
402 found in *m*-synephrine group (1.6 ± 1.1 $\mu\text{M}/\text{mg}$ of protein). Moreover, this low *m*-
403 synephrine intracellular concentration elicited significant GSht and GSH depletion
404 (Figure 6). Glutathione depletion has been associated with electrophysiological
405 remodeling in cardiomyocytes from rat and in canine models (45, 46). This is an
406 important remark since this imbalance in cardiac glutathione levels can increase the
407 risk of arrhythmias, myocardium infarction, and cardiac death (45, 46).

408 Furthermore, we were able to totally avoid *m*-synephrine-induced imbalance in
409 intracellular glutathione levels with two different antioxidants, NAC (1 mM) and Tiron
410 (100 μM) (Figure 6). NAC is a powerful nucleophile which directly scavenges several
411 ROS (47) and is also the acetylated precursor of GSH. It can replenish glutathione in
412 studies with longer incubation period (48), however, in the present study, this effect
413 upon glutathione synthesis is not relevant considering the short incubation period of 3
414 h. Tiron is a more specific scavenger, which acts on the superoxide anions, and is
415 considered a superoxide dismutase mimetic (49). Altogether, our results demonstrate
416 that the glutathione depletion observed when cardiomyocytes were incubated with *m*-
417 synephrine (1 mM) for 3 h was related to increases in intracellular ROS formation. In

418 order to investigate if the glutathione depletion promoted by *m*-synephrine was
419 related to the α_1 -adrenoceptors activation, we performed a study with prazosin at a
420 concentration (100 nM) previously described to selectively antagonize α_1 -
421 adrenoceptors (23, 36). As already mentioned, *m*-synephrine is a potent α_1 - agonist
422 (7), and it is well known that the stimulation of α_1 -adrenoceptors leads to increases in
423 intracellular ROS through the reduced β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
424 (NADPH) oxidase pathway (36). We showed that the effects of *m*-synephrine on
425 glutathione levels were independent of α_1 -adrenoceptors stimulation, since co-
426 incubation with prazosin did not prevented the changes in the glutathione status
427 induced by the isomer. The increases in intracellular ROS could be related to the
428 auto-oxidation of *m*-synephrine. In fact, the oxidation of synephrine through the
429 tyrosinase pathway was already described in a study with mushroom tyrosinase (50).

430 Interestingly, GSH depletion induced by *m*-synephrine was not accompanied by a
431 corresponding increase in GSSG levels. One possibility that could explain this finding
432 is that the GSSG formed could be exported to the extracellular medium. It is well
433 known that the multidrug resistance protein 1 transporter (MRP1), present in
434 cardiomyocytes, might have a role in the cellular response to oxidative stress, namely
435 mediating the cellular efflux of GSH conjugates and GSSG (30, 51). Another
436 hypothesis is the formation of synephrine's GSH-conjugates, similar to what is
437 observed with adrenaline (18), that decrease intracellular GSH with no changes in
438 GSSG levels.

439 Although toxicological studies concerning synephrine are still scarce, existing case
440 reports suggest a cardiotoxic potential for synephrine (10-15). The toxicity of *m*-
441 synephrine is better understood considering its use as a decongestant (52, 53), a
442 vasopressor agent, and a midriatic agent (1). Frequently, the cardiac effects of *m*-
443 synephrine are related to the pronounced stimulation of α_1 -adrenoceptors (54-57).
444 However, in the present study, we observed that the cardiac adverse effects induced
445 by the *m*-isoform of synephrine in isolated cardiomyocytes is independent of α_1 -
446 adrenoceptors stimulation. Despite the more abundant entrance of *p*-synephrine into
447 cardiomyocytes, this positional isomer seems to be innocuous under the experimental
448 conditions. *In vivo* studies also demonstrated a negligible toxicity of *p*-synephrine (4,
449 43, 44). In fact, our results corroborate that *m*- and *p*-synephrine clearly show
450 different toxicological profiles. Although *m*-synephrine can also be found in weight-
451 loss products (5, 6), most safety studies concerning synephrine's use in weight-loss
452 only evaluate the *p*-isoform (4, 43, 44). This fact could explain the discrepancy

453 between existing toxicological studies, which indicates the low toxicity of *p*-
454 synephrine, and the important case reports of cardiotoxicity concerning synephrine-
455 containing weight-loss products.
456

457

458 **5. Acknowledgments**

459 This work received financial support from the Portuguese State through “Fundação
460 para a Ciência e Tecnologia” (FCT) (project PPCDT/SAU-OBS/55849/2004). LGR
461 thanks FCT for her PhD grant (SFRH/BD/63473/2009) and VMC thanks FCT for her
462 Post-PhD grant (SFRH/BPD/63746/2009).

463

464

465 6. References

- 466 (1) Haaz, S., Fontaine, K. R., Cutter, G., Limdi, N., Perumean-Chaney, S. and
467 Allison, D. B. (2006) *Citrus aurantium* and synephrine alkaloids in the
468 treatment of overweight and obesity: an update. *Obes Rev* 7, 79-88.
- 469 (2) Andrade, A. S., Schmitt, G. C., Rossato, L. G., Russowsky, D. and Limberger,
470 R. P. (2009) Gas chromatographic method for analysis of *p*-synephrine in
471 *Citrus aurantium* L. products. *Chromatographia*, S225-S229.
- 472 (3) Fugh-Berman, A. and Myers, A. (2004) *Citrus aurantium*, an ingredient of
473 dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and
474 basic research. *Exp Biol Med* 229, 698-704.
- 475 (4) Arbo, M. D., Larentis, E. R., Linck, V. M., Aboy, A. L., Pimentel, A. L.,
476 Henriques, A. T., Dallegrave, E., Garcia, S. C., Leal, M. B. and Limberger, R.
477 P. (2008) Concentrations of *p*-synephrine in fruits and leaves of *Citrus* species
478 (Rutaceae) and the acute toxicity testing of *Citrus aurantium* extract and *p*-
479 synephrine. *Food Chem Toxicol* 46, 2770-2775.
- 480 (5) Allison, D. B., Cutter, G., Poehlman, E. T., Moore, D. R. and Barnes, S. (2005)
481 Exactly wich synephrine alkaloids does *Citrus aurantium* (Bitter Orange)
482 contain? *Int J Obes* 29, 443-446.
- 483 (6) Greenway, F., Jonge-Levitan, L., Martin, C., Roberts, A., Grundy, I. and
484 Parker, C. (2006) Dietary herbal supplements with phenylephrine for weight
485 loss. *J Med Food* 9, 572-578.
- 486 (7) Brown, C. M., McGrath, J. C., Midgley, J. M., Muir, A. G., O'Brien, J. W.,
487 Thonoor, C. M., Williams, C. M. and Wilson, V. G. (1988) Activities of
488 octopamine and synephrine stereoisomers on alpha-adrenoceptors. *Br J*
489 *Pharmacol* 93, 417-429.
- 490 (8) Hoffman, J. R., Kang, J., Ratamess, N. A., Jennings, P. F., Mangine, G. and
491 Faigenbaum, A. D. (2006) Thermogenic effect from nutritionally enriched
492 coffee consumption. *J Int Soc Sports Nutr* 3, 35-41.
- 493 (9) Blanck, H. M., Serdula, M. K., Gillespie, C., Galuska, D. A., Sharpe, P. A.,
494 Conway, J. M., Khan, L. K. and Ainsworth, B. E. (2007) Use of nonprescription
495 dietary supplements for weight loss is common among Americans. *J Am Diet*
496 *Assoc*, 441-447.
- 497 (10) Gange, C. A., Madias, C., Felix-Getzik, E. M., Weintraub, A. R. and Estes, N.
498 A. M. (2006) Variant angina associated with bitter orange in a dietary
499 supplement. *Mayo Clin Proc* 81, 545-548.
- 500 (11) Nykamp, D. L., Fackih, M. N. and Compton, A. L. (2004) Possible association
501 of acute lateral-wall myocardial infarction and bitter orange supplement. *Ann*
502 *Pharmacother* 38, 812-816.
- 503 (12) Nasir, J. M., Durning, S., Ferguson, M., Barold, H. S. and Haigney, M. C.
504 (2004) Exercise-induced syncope associated with QT-prolongation and
505 ephedra-free Xenadrine. *Mayo Clin Proc* 78, 1059-1062.
- 506 (13) Bui, L. T., Nguyen, D. T. and Ambrose, P. J. (2006) Blood pressure and heart
507 rate effects following a single dose of bitter orange. *Ann Pharmacother* 40, 53-
508 57.
- 509 (14) Thomas, J. E., Munir, J. A., McIntyre, P. Z. and Ferguson, M. A. (2009) STEMI
510 in a 24-year-old man after use of a synephrine-containing dietary supplement:
511 a case report and review of the literature. *Text Heart Inst J* 36, 586-590.
- 512 (15) Jordan, S., Murty, M. and Pilon, K. (2004) Products containing bitter orange or
513 synephrine: suspected cardiovascular adverse reactions. *Can Med Assoc J*
514 171, 993-994.

- 515 (16) Kovacic, P. and Cooksy, A. L. (2005) Unifying mechanism for toxicity and
516 addiction by abused drugs: electron transfer and reactive oxygen species.
517 *Med Hypotheses* 64, 357-366.
- 518 (17) Yamamoto, B. K. and Zhu, W. (1998) The effects of metamphetamine on the
519 production of free radicals and oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 287,
520 107-114.
- 521 (18) Costa, V. M., Silva, R., Ferreira, M. L., Branco, P. S., Carvalho, F., Bastos, M.
522 L., Carvalho, R. A., Carvalho, M. and Remião, F. (2007) Oxidation process of
523 adrenaline in freshly isolated rat cardiomyocytes: formation of adrenochrome,
524 quinoproteins and GSH adduct. *Chem Res Toxicol* 20, 1183-1191.
- 525 (19) Remião, F., Carvalho, M., Carmo, H., Carvalho, F. and Bastos, M. L. (2002)
526 Cu⁺² induced isoproterenol oxidation into isoprenochrome in adult rat calcium-
527 tolerant cardiomyocytes. *Chem Res Toxicol* 15, 861-869.
- 528 (20) Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F. and Bastos, M. L. (2001) Copper
529 enhances isoproterenol toxicity in isolated rat cardiomyocytes. *Cardiovasc*
530 *Toxicol*, 195-204.
- 531 (21) Carvalho, M., Remião, F., Milhazes, N., Borges, F., Fernandes, E., Monteiro,
532 M. C., Gonçalves, M. J., Seabra, V., Amado, F., Carvalho, F. and Bastos, M.
533 L. (2004) Metabolism is required for the expression of ecstasy-induced
534 cardiotoxicity in vitro. *Chem Res Toxicol* 17, 623-632.
- 535 (22) Costa, V. M., Silva, R., Tavares, L. C., Vitorino, R., Amado, F., Carvalho, F.,
536 Bastos, M. L., Carvalho, M., Carvalho, R. A. and Remião, F. (2009)
537 Adrenaline and reactive oxygen species elicit proteome and energetic
538 metabolism modifications in freshly isolated rat cardiomyocytes. *Toxicology*
539 260, 84-96.
- 540 (23) Costa, V. M., Silva, R., Ferreira, R., Amado, F., Carvalho, F., de Lourdes
541 Bastos, M., Carvalho, R. A., Carvalho, M. and Remião, F. (2009) Adrenaline in
542 pro-oxidant conditions elicits intracellular survival pathways in isolated rat
543 cardiomyocytes. *Toxicology* 257, 70-79.
- 544 (24) Rossato, L. G., Pinho, P. G., Silva, R., Carmo, H., Carvalho, F., Bastos, M. L.,
545 Costa, V. M. and Remião, F. (2010) Development and validation of a GC/IT-
546 MS method for simultaneous quantitation of *para* and *meta*-synephrine in
547 biological samples. *J Pharm Biomed Anal* 52, 721-726.
- 548 (25) Wu, X., George, R., Huang, W., Wang, H., Conway, S., Leibach, F. and
549 Ganapathy, V. (2000) Structural and functional characteristics and tissue
550 distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from
551 placenta. *Biochem Biophys Acta* 1466, 315-327.
- 552 (26) Grube, M., Meyer zu Schwabedissen, H., Prager, D., Haney, J., Moritz, K.,
553 Meissner, K., Roskopf, D., Eckel, L., Bohm, M., Jedlitschky, G. and Kroemer,
554 H. (2006) Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: expression,
555 regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5).
556 *Circulation*. 113, 1114-1122.
- 557 (27) McBride, B. F., Yang, T., Liu, K., Urban, T. J., Giacomini, K. M., Kim, R. B. and
558 Roden, D. M. (2009) The organic cation transporter, OCTN1, expressed in the
559 human heart, potentiates antagonism of the HERG potassium channel. *J*
560 *Cardiovasc Pharmacol* 54, 63-71.
- 561 (28) Iwata, D., Kato, Y., Wakayama, T., Sai, Y., Kubo, Y., Iseki, S. and Tsujo, A.
562 (2008) Involvement of carnitine/organic cation transporter OCTN2 in
563 distribution of its substrate carnitine to the heart. *Drug Metab Pharmacokinet*
564 23, 207-215.
- 565 (29) Koepsell, H., Lips, K. and Volk, C. (2007) Polyspecific Organic Cation
566 Transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical
567 implications. *Pharm Res* 24, 1227-1251.

- 568 (30) Costa, V. M., Ferreira, M. L., Branco, P. S., Carvalho, F., Bastos, M. L.,
569 Carvalho, R. A., Carvalho, M. and Remião, F. (2009) Cross-functioning
570 between the extraneuronal monoamine transporter and multidrug resistance
571 protein 1 in the uptake of adrenaline and export of 5-(Glutathion-S-
572 yl)adrenaline in rat cardiomyocytes. *Chem Res Toxicol* 22, 129-135.
- 573 (31) Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F. and Bastos, M. L. (2001) The study of
574 oxidative stress in freshly isolated Ca^{2+} tolerant cardiomyocytes from the adult
575 rat. *Toxicol In Vitro* 15, 283-287.
- 576 (32) Remião, F., Rettori, D., Han, D., Carvalho, F., Bastos, M. L. and Cadenas, E.
577 (2004) Leucoisoprenochrome-o-semiquinone formation in freshly isolated
578 adult rat cardiomyocytes. *Chem Res Toxicol* 17, 1584-1590.
- 579 (33) Obst, O., Rose, H. and Kammermeier, H. (1996) Characterization of
580 catecholamine uptake₂ in isolated cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem* 163-
581 164, 181-183.
- 582 (34) Oosthuizen, M. M. and Greyling, D. (1999) Antioxidants suitable for use with
583 chemiluminescence to identify oxyradical species. *Redox report :
584 communications in free radical research* 4, 277-290.
- 585 (35) Carvalho, M., Remião, F., Milhazes, N., Borges, F., Fernandes, E., Carvalho,
586 F. and Bastos, M. L. (2004) The toxicity of N-methyl-[alpha]-methyldopamine
587 to freshly isolated rat hepatocytes is prevented by ascorbic acid and N-
588 acetylcysteine. *Toxicology* 200, 193-203.
- 589 (36) Amin, J., Xiao, L., Pimental, D., Pagano, P., Singh, K., Sawyer, D. and
590 Colucci, W. (2001) Reactive oxygen species mediate alpha-adrenergic
591 receptor-stimulated hypertroph in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell
592 Cardiol* 12, 1099-1104.
- 593 (37) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein
594 measurement with the Folin phenol reagent *J Biol Chem* 193, 265-272.
- 595 (38) Hayger-Zillgen, M., Bruss, M. and Bonish, H. (2002) Expression and
596 pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1,
597 hOCT2, and hOCT3. *Br J Pharmacol* 136, 829-836.
- 598 (39) Koepsell, H. (2004) Polyspecific organic cation transporters: their functions
599 and interactions with drugs. *Trends Pharmacol Sci* 25, 375-381.
- 600 (40) Ohashi, R., Tamai, I., Yabuuchi, H., Nezu, J., Oku, A., Sai, Y., Shimane, M.
601 and Tsuji, A. (1999) Na^+ dependent carnitine transport by organic cation
602 transporter (OCTNS): its pharmacological and toxicological relevance. *J
603 Pharm Exp Ther* 291, 778-784.
- 604 (41) Engel, K. and Wang, J. (2005) Interaction of organic cations with a newly
605 identified plasma membrane monoamine transporter. *Mol Pharmacol* 68,
606 1397-1407.
- 607 (42) Engel, K., Zhou, M. and Wang, J. (2004) Identification and characterization of
608 a novel monoamine transporter in the human brain. *J Biol Chem* 279, 50042-
609 50049.
- 610 (43) Arbo, M. D., Schmitt, G. C., Limberger, M. F., Charao, M. F., Moro, A. M.,
611 Ribeiro, G. L., Dallegrave, E., Garcia, S. C., Leal, M. B. and Limberger, R. P.
612 (2009) Subchronic toxicity of *Citrus aurantium* L. (*Rutaceae*) extract and *p*-
613 synephrine in mice. *Regul Toxicol Pharmacol*.
- 614 (44) Arbo, M. D., Franco, M. T., Larentis, E. R., Garcia, S. C., Sebben, V. C., Leal,
615 M. B., Dallegrave, E. and Limberger, R. P. (2008) Screening for *in vivo*
616 (anti)estrogenic activity of ephedrine and *p*-synephrine and their natural
617 sources *Ephedra sinica* Stapf. (*Ephedraceae*) and *Citrus aurantium* L.
618 (*Rutaceae*) in rats. *Arch Toxicol*.
- 619 (45) Sridhar, A., Nishijima, Y., Terentyev, D., Khan, M., Terentyeva, R., Hamlin, R.
620 L., Nakayama, T., Gyorke, S., Cardounel, A. J. and Carnes, C. A. (2009)

- 621 Chronic heart failure and the substrate for atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 84,
622 227-236.
- 623 (46) Zheng, M. Q., Tang, K., Zimmerman, M. C., Liu, L., Xie, B. and Rozanski, G.
624 J. (2010) Role of gama-glutamyl transpeptidase in redox regulation of K⁺
625 channel remodeling in postmyocardial infarction rat hearts. *Am J Physiol Cell*
626 *Physiol* 297, C253-C262.
- 627 (47) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1998) Antioxidant defenses, In *Free*
628 *Radicals in Biology and Medicine* (Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., Eds.)
629 pp 105-245, Oxford University, Oxford.
- 630 (48) Forman, M., Puett, D., Cates, C., McCroskey, D., Beckman, J., Greene, H.
631 and Virmani, R. (1988) Glutathione redox pathway and reperfusion injury.
632 Effect of N-acetylcysteine on infarct size and ventricular function. *Circulation*
633 *Jul* 78, 202-213.
- 634 (49) Ghosh, M., Wang, H. D. and McNeill, R. (2002) Tiron exerts effects unrelated
635 to its role as a scavenger os superoxide anion: effects on calcium binding and
636 vascular reponses. *Can J Physiol Pharmacol* 80, 755-760.
- 637 (50) Garcia-Carmona, F., Cabanes, J. and Garcia-Canovas, F. (1987) Kinetic
638 study of synephrine oxidation by mushroom tyrosinase. *Biochem Int* 14,
639 1003-1013.
- 640 (51) Cole, S. P. C. and Deeley, R. G. (2006) Transport of glutathione and
641 glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol Sci* 27, 438-446.
- 642 (52) Santana, J., Sharpless, K. E. and Nelson, B. C. (2008) Determination of *p*-
643 synephrine and *m*-synephrine positional isomers in bitter orange-containing
644 supplements by LC/UV and LC/MS/MS. *Food Chem* 109, 675-682.
- 645 (53) Martindale. (2004) Phenylephrine, In *The complete drug reference*, Electronic
646 version, London, UK.
- 647 (54) Navarro-Sobrinho, M., Lorita, J., Soley, M. and Ramirez, I. (2010)
648 Catecholamine-induced heart injury in mice: differential effects of
649 isoproterenol and phenylephrine. *Histol Histopathol* 25, 589-597.
- 650 (55) Thomas, G. P. and Tripathi, R. M. (1986) Effects of alpha-adrenoceptor
651 agonists and antagonists on ouabain-induced arrhythmias and cardiac arrest in
652 guinea pig. *Br J Pharmacol* 89, 385-388.
- 653 (56) Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M. and Flower, R. J. (2007) Rang and
654 Dale's Pharmacology, pp 168-189, Churchill Livingstone.
- 655 (57) Terzic, A. and Vogel, S. M. (1991) On the mecanism of the positive inotropic
656 action of the alpha-adrenoceptor agonist, phenylephrine, in isolated rat left
657 aorta *J Pharmacol Exp Ther* 257, 520-529.
- 658
- 659
- 660

661

662 **LEGENDS:**

663 **Figure 1:** Chemical structures of compounds with structural similarities to synephrine.

664 **Figure 2:** Comparison of intracellular levels of *m*- and *p*-synephrine in cardiomyocytes
665 incubated for 3 h with 1 mM *m*-synephrine or 1 mM *p*-synephrine. Results are
666 presented as means ($\mu\text{M}/\text{mg}$ of protein) \pm SD from 16 different experiments.
667 Statistical comparison was made using the Mann-Whitney Rank Sum test ($**p < 0.01$
668 vs *m*-syn).

669 **Figure 3:** A) Intracellular content of *m*-synephrine (*m*-syn) in cardiomyocytes
670 incubated for 3 h with 1 mM *m*-syn and 1 mM *m*-syn + 100 μM CORT. Results are
671 presented as means (%) \pm SD from 6 different experiments. B) Intracellular content of
672 *m*-synephrine (*m*-syn) in cardiomyocytes incubated for 3 h with 1 mM *m*-syn and 1
673 mM *m*-syn + 100 μM QUIN. Results are presented as means (%) \pm SD from 7
674 different experiments. Statistical comparison was made using the Mann-Whitney Rank
675 Sum test ($**p < 0.01$ vs *m*-syn).

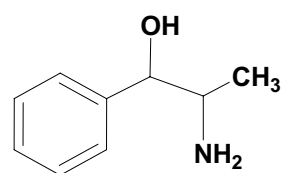
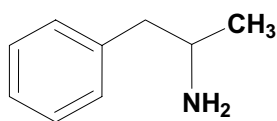
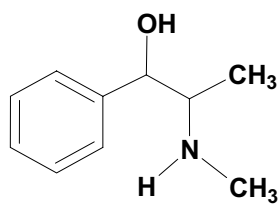
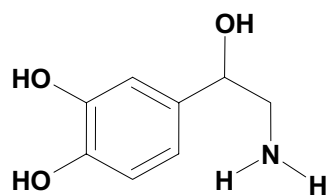
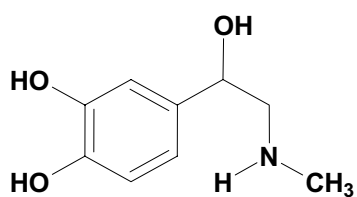
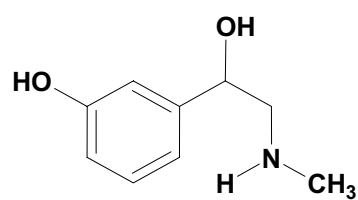
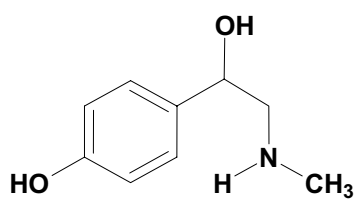
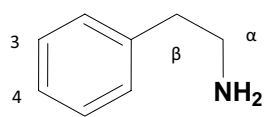
676 **Figure 4:** A) Intracellular content of *p*-synephrine (*p*-syn) in cardiomyocytes incubated
677 for 3 h with 1 mM *p*-syn and 1 mM *p*-syn + 100 μM CORT. Results are presented as
678 means (%) \pm SD from 6 different experiments. B) Intracellular content of *p*-synephrine
679 (*p*-syn) in cardiomyocytes incubated for 3 h with 1 mM *p*-syn and 1 mM *p*-syn + 100
680 μM QUIN. Results are presented as means (%) \pm SD from 8 different experiments.
681 Statistical comparison was made using the Mann-Whitney Rank Sum test ($**p < 0.01$
682 vs *p*-syn).

683 **Figure 5:** Total glutathione (GSht) intracellular levels in cardiomyocytes in control
684 group and in cardiomyocytes incubated with 1 mM *p*-synephrine (*p*-syn) for 3 h.
685 DMSO was used as vehicle. Results are presented as means \pm SD from 3 different
686 experiments. No statistical differences were observed between groups.

687 **Figure 6:** A) Total glutathione (GSht) in cardiomyocytes in control, 1 mM *m*-
688 synephrine (*m*-syn), 1 mM *m*-synephrine with 100 μM Tiron (Tiron + *m*-syn), and 100
689 μM Tiron groups after a 3 h incubation. B) GSH intracellular levels in cardiomyocytes
690 in control, 1 mM *m*-synephrine (*m*-syn), 1 mM *m*-synephrine with 100 μM Tiron (Tiron
691 + *m*-syn), and 100 μM Tiron groups after a 3 h incubation. C) GSht intracellular levels
692 in cardiomyocytes in control, 1 mM *m*-synephrine (*m*-syn), 1 mM *m*-synephrine with 1
693 mM NAC (NAC + *m*-syn), and 1 mM NAC groups after a 3 h incubation. D) GSH

694 intracellular levels in cardiomyocytes in control, 1 mM *m*-synephrine (*m*-syn), 1 mM
695 *m*-synephrine with 1 mM NAC (NAC + *m*-syn), and 1 mM NAC groups after a 3 h
696 incubation. Results are presented as means (μM) \pm SD from 5 different experiments.
697 Statistical comparisons were made using Kruskal-Wallis test, followed by the Student-
698 Newman-Keuls *post hoc* test (* $p < 0.05$ vs control).
699

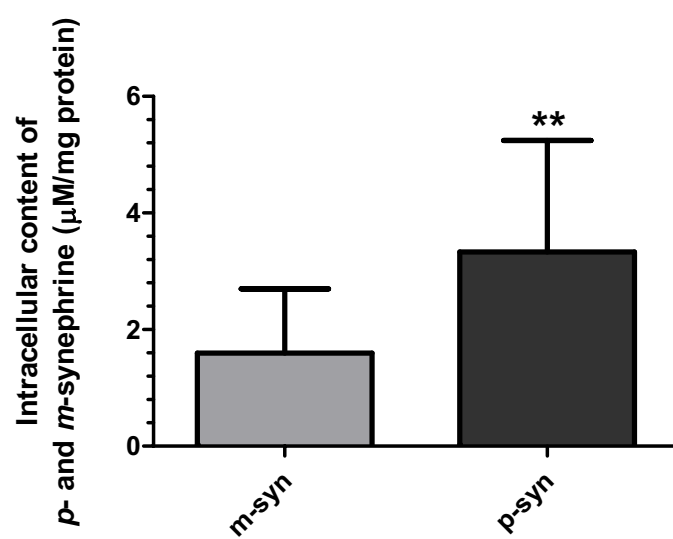
700 **Figure 1:**



701

702

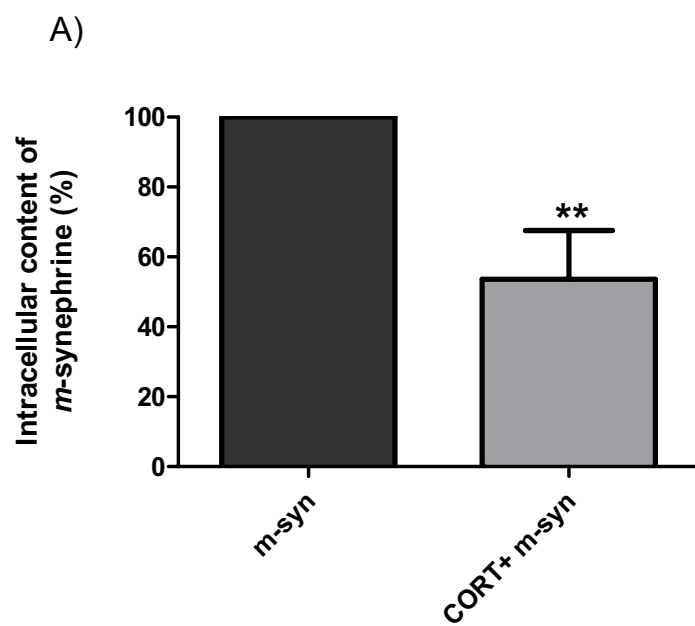
703 **Figure 2:**



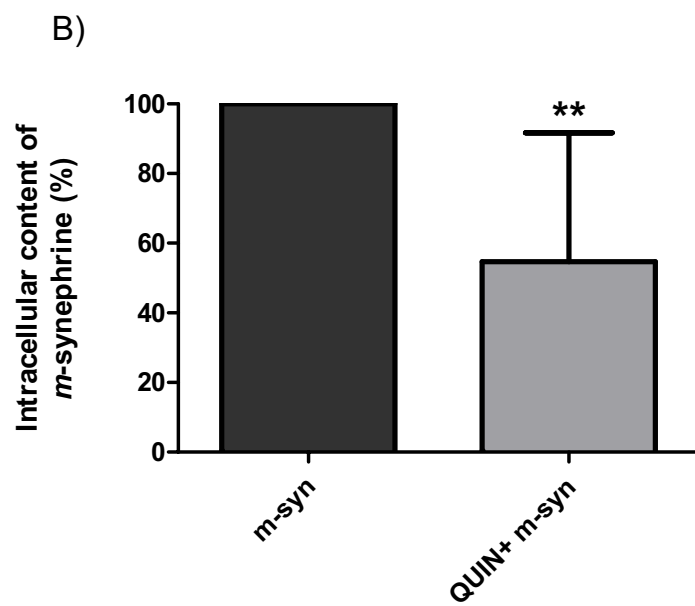
704

705

706 **Figure 3:**



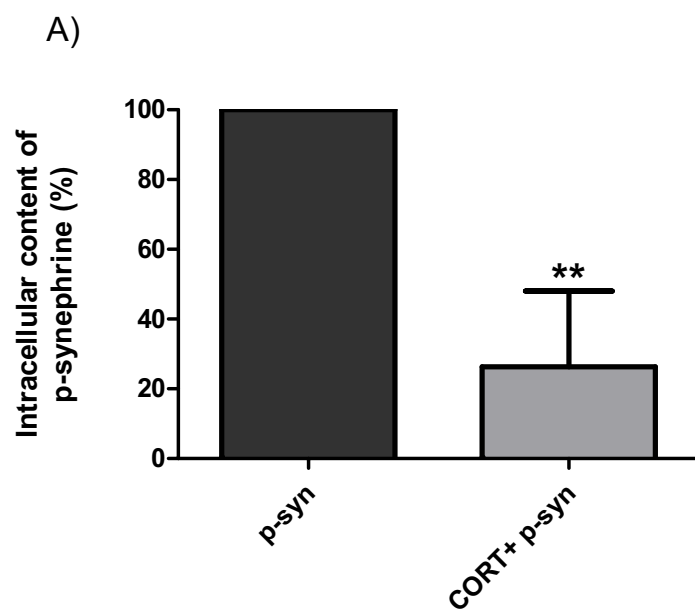
707



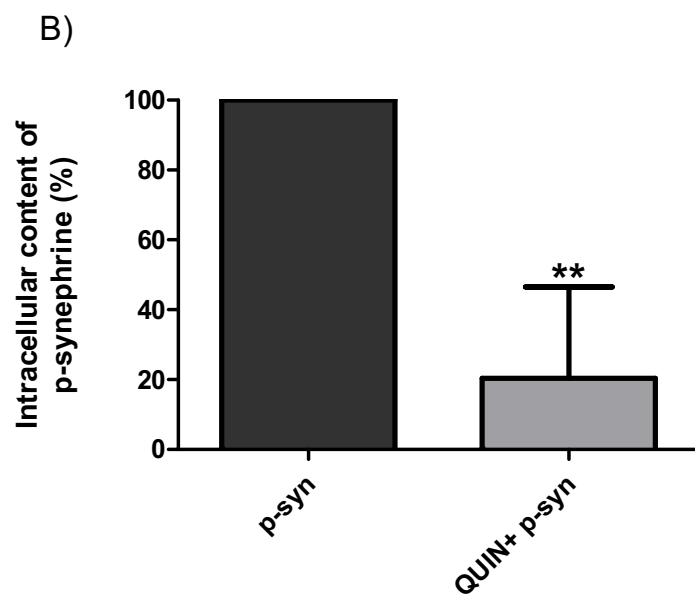
708

709

710 **Figure 4:**



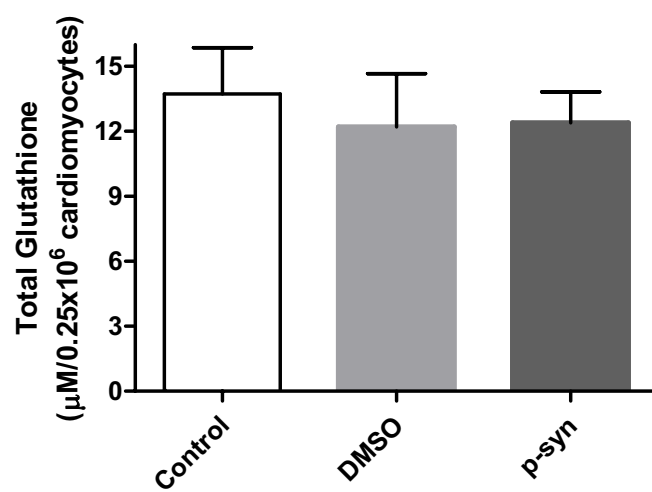
711



712

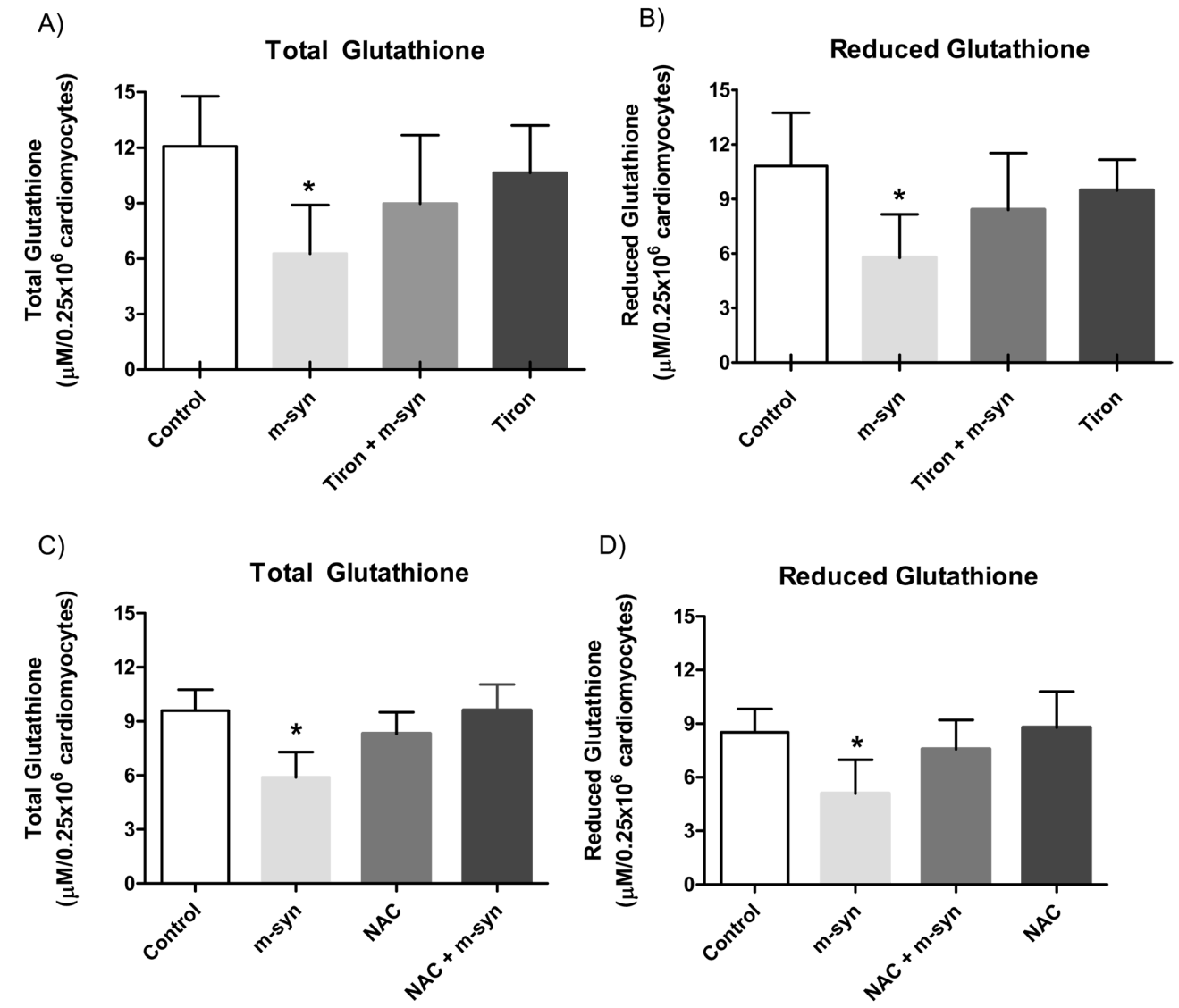
713

714 **Figure 5:**



715

Figure 6)



Secção IV)

DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

IV.1) Validação do método

Tal como apresentado no manuscrito I, foi desenvolvido e validado um método por cromatografia gasosa com captura de iões acoplada a detector de massa (GC/IT-MS) para a quantificação simultânea da *p*- e *m*-sinefrina. Conforme os parâmetros avaliados, o protocolo proposto pode ser considerado uma boa metodologia de análise de sinefrina em amostras biológicas. A validação demonstrou que o presente método apresenta linearidade num grande intervalo de concentrações (10 ng/mL a 10 µg/mL) e possui melhor recuperação para as concentrações menores quando comparado com outros métodos (ver manuscrito I, secção 3) (134).

Uma grande vantagem deste método é permitir a análise simultânea dos dois isómeros posicionais (*m*- e *p*-sinefrina) com baixos LOQ e LOD (10 ng/mL e 3 ng/mL, respectivamente), uma vez que, geralmente, os consumidores de suplementos alimentares ingerem ambos (4). Desta forma, através deste método é possível fazer estudos farmacocinéticos na ingestão de produtos dietéticos.

A matriz celular escolhida para a validação (células Caco-2) não apresentou picos interferentes para a análise de sinefrina, demonstrando que a SPE que precedeu a análise foi eficiente na purificação das amostras. A metodologia apresentada também pode ser considerada específica, uma vez que compostos endógenos que poderiam estar presentes nas amostras biológicas, nomeadamente noradrenalina, dopamina e octopamina não interferiram na análise dos picos cromatográficos dos analitos e do padrão interno. Os metabolitos e substâncias frequentemente presentes em suplementos alimentares (caféina, efedrina e anfetamina), quer como adjuvantes para perda de peso ou mesmo como contaminantes/adulterantes, também foram avaliados por este método e não constituíram qualquer interferência para a análise dos picos cromatográficos, quer dos isómeros da sinefrina como do padrão interno. Desta forma, confirma-se, portanto, a selectividade do método (ver manuscrito I, secção 3) (134).

Os métodos de cromatografia e electroforese figuram entre as técnicas analíticas preferidas devido a sua alta capacidade de separar os constituintes da amostra antes da

detecção dos seus componentes individuais (19). Tratando-se de metodologias disponíveis na literatura, os equipamentos mais utilizados para a análise de sinefrina são a cromatografia líquida (LC), a electroforese capilar (EC), e a GC.

A LC é uma técnica bastante utilizada porque agrega sensibilidade, precisão e especificidade nas análises (19). Além disso, não promove degradação térmica do analito e não necessita de etapas prévias como a de volatilização da amostra. Embora a maioria dos métodos propostos para a quantificação da sinefrina utilize a cromatografia líquida de alta resolução com detecção ultravioleta (HPLC/UV) (2, 12, 15, 72, 109-111, 113, 115, 116), este tipo de método não é isento de limitações. Quando empregue para a análise de matrizes complexas como as encontradas em suplementos alimentares, por exemplo, a inespecificidade associada à coeluição de análogos estruturais e outros interferentes pode ser uma desvantagem desta técnica (25). Além disso, o comprimento de onda de detecção por ultravioleta da sinefrina (220 nm) não apresenta especificidade, uma vez que muitos compostos, inclusive muitas moléculas presentes em extractos naturais, absorvem neste mesmo comprimento de onda. O detector de massas, porém, consegue superar esta limitação do detector UV e aumentar a selectividade da análise. Existem dois trabalhos utilizando a abordagem com LC/MS (48, 117): um deles não apresenta os parâmetros da validação e o outro possui uma menor recuperação da sinefrina quando comparado ao método apresentado nesta dissertação (ver manuscrito I, secção 3) (134).

A EC é reconhecida como uma técnica de separação que agrega vantagens como rapidez, eficiência, reprodutibilidade, baixo consumo de solventes, pouco volume de amostra e fácil remoção de contaminantes. Por tudo isso, pode ser considerada ideal para determinações em matrizes complexas como é o caso dos produtos naturais e amostras biológicas (19). Porém, tal metodologia ainda não é muito popular para a análise de sinefrina (14), mas apresenta um elevado potencial.

A GC ainda é uma abordagem pouco explorada para a análise de sinefrina quando comparada à LC (1, 20, 112). Considerando as metodologias de análise de sinefrina em amostras biológicas por GC/MS, em 1990, Watson e colaboradores publicaram um estudo onde compararam a concentração da sinefrina em urina e humor vítreo de indivíduos hipertensos e normais (1). Os parâmetros de validação da metodologia utilizada não foram apresentados neste trabalho e os autores afirmam que muitas vezes as concentrações se encontraram abaixo do LOD, o que representa uma limitação importante deste método.

Apesar da sinefrina não ser um composto naturalmente volátil, esta limitação pode ser facilmente superada através da derivatização. As reacções de derivatização mais comuns são: sililação com N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA), N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) e N-*tert*-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA); acilação com anidrido acético (AA), ATFA ou anidrido pentafluoropropânico (PFPA); alquilação com diazometano seguida por reacção com fosfogénio (reagentes extremamente tóxicos e por isso não recomendados); condensação com compostos carbonílicos de aldeídos e cetonas e a preparação de derivados cíclicos através de reacções com ciclohexanona (25). Recentemente, Andrade comparou o desempenho da ciclohexanona, do anisaldeído, do benzaldeído e do ATFA como reagentes de derivatização para a sinefrina e os melhores resultados foram obtidos com a ciclohexanona (25). A derivatização com ATFA apresentada nesta dissertação demonstrou ser satisfatória para a análise de sinefrina, uma vez que produziu cromatogramas bem resolvidos, em que os analitos e o padrão interno possuem tempos de retenção distintos (134).

A metodologia apresentada nesta dissertação, além de ser útil para os estudos farmacocinéticos de produtos dietéticos, pode ser facilmente adaptada para estudos da sinefrina enquanto amina biogénica (134).

IV.2) Estudos da internalização de m- e p-sinefrina em células Caco-2

Para comprovar a aplicabilidade do método, realizou-se um estudo de internalização da *m*- e *p*-sinefrina em cultura de células Caco-2. Após 3 h de incubação com ambos isómeros isoladamente, a quantidade internalizada de sinefrina foi avaliada por GC/IT-MS. As concentrações detectadas foram na ordem dos 26 μ M e 12 μ M para os dois isómeros quando as células foram expostas a concentrações iniciais de 1 mM e 500 μ M, respectivamente (134).

A linha celular Caco-2 é um modelo *in vitro* muito utilizado no estudo da absorção intestinal (118-120, 135), já que a maioria dos xenobióticos administrados por via oral são absorvidos no intestino. A biodisponibilidade após administração oral de bases fracas, como a sinefrina, geralmente está compreendida entre 35 e 75% (136-138). No entanto, no

presente estudo, a internalização da sinefrina pelas células Caco-2 foi de aproximadamente 2,5%. Estudos em humanos com a sinefrina sugerem que este composto tem uma baixa absorção, uma vez que após a ingestão de 5,5; 21 ou 46,9 mg de sinefrina, as concentrações plasmáticas máximas encontradas foram 0,27; 1,75 e 2,85 ng/mL, respectivamente (11, 51).

Embora a *m*-sinefrina e *p*-sinefrina tenham diferente potência farmacológica (26), os dois isómeros posicionais foram transportados com a mesma capacidade para o interior das células Caco-2, conforme evidenciado pela detecção de concentrações intracelulares semelhantes. Curiosamente, uma quantidade residual de *p*-sinefrina foi detectada no interior das células expostas à *m*-sinefrina. Essa observação não pode ser explicada pela presença de impurezas no padrão de *m*-sinefrina, uma vez que, no estabelecimento das curvas de calibração e demais determinações, não se observou indícios da presença de *p*-sinefrina no padrão *m*-sinefrina (134). Considerando os casos de conversão entre isómeros, Kusu e colaboradores observaram que cerca de 20 a 50% da (-)-sinefrina ingerida era eliminada na forma conjugada e 10% na forma de (+)-sinefrina. Assim, os autores defenderam a hipótese de que a (-)-sinefrina sofria conversão quiral *in vivo* para a forma (+) (50). Contudo, é preciso cautela na interpretação destes resultados, uma vez que as amostras de urina utilizadas neste trabalho foram hidrolisadas a 100 °C. Como já mencionado nesta dissertação, altas temperaturas ou períodos prolongados de aquecimento podem promover interconversão óptica da sinefrina (19). Porém, casos de conversão posicional entre os isómeros da sinefrina nunca foram descritos, excepto no artigo apresentado nesta dissertação (134). Considerando que as amostras utilizadas neste trabalho não foram submetidas a condições químicas drásticas, a possível conversão entre isómeros posicionais pode ser resultado de acção metabolizadora das células Caco-2 (139), facto, que, no entanto, necessita de ser confirmado.

Em conclusão, através deste estudo, foi possível comprovar a aplicabilidade do método validado, que posteriormente foi utilizado com sucesso para o estudo do transporte de *m*- e *p*-sinefrina em cardiomiócitos (134, 140).

IV.3) Estudos do transporte de *m*- e *p*-sinefrina em cardiomiócitos tolerantes ao cálcio isolados de rato adulto

Na segunda fase de estudos, procedemos à avaliação da capacidade de entrada e quais os transportadores envolvidos na internalização dos dois isômeros da sinefrina, em cardiomiócitos isolados de rato adulto.

Neste estudo, foi possível evidenciar a importância dos OCTs, OCT1 e OCT3, no transporte de *p*- e *m*-sinefrina nos cardiomiócitos, uma vez que as concentrações intracelulares de sinefrina reduziram-se substancialmente quando as células foram pré-incubadas com quinidina (100 µM) e corticosterona (CORT) (100 µM) (ver manuscrito II, secção 3) (140). Para uma concentração inicial de 1 mM de *m*- ou *p*-sinefrina, não foi possível observar diferenças na magnitude de inibição obtida com CORT ou quinidina. Importante referir que os níveis intracelulares detectados nos cardiomiócitos após 3 h de incubação com *m*- ou *p*-sinefrina foram estatisticamente diferentes, sendo que foram superiores para a incubação com o isómero *p*- substituído, como se pode observar no manuscrito II desta dissertação (140). O transporte mediado pelo OCT3 e OCT1 parece ter maior relevância na internalização da *p*-sinefrina. Os resultados apresentados nesta dissertação sugerem que o OCT3 e o OCT1, presentes em cardiomiócitos humanos e de rato, compartilham semelhanças nos substratos, porém têm maior afinidade para a posição *p*- no anel aromático (140).

Os OCTs (OCT1, OCT2 e OCT3) são considerados transportadores multiespecíficos responsáveis pelo transporte de inúmeros xenobióticos (141). A sinefrina é uma base fraca com propriedades físico-químicas compatíveis com os substratos preferencialmente translocados por estes transportadores (142). Além disso, um estudo recente comprovou a funcionalidade destes transportadores nos cardiomiócitos tolerantes ao cálcio isolados de rato adulto (132), ratificando que este é um modelo adequado para estudos desta natureza. O OCT3 possui uma ampla distribuição, sendo expresso predominantemente no músculo esquelético, fígado, placenta e coração, enquanto que o OCT1 encontra-se expresso no fígado, rim, intestino e no coração. O OCT2 não será abordado, uma vez que a sua expressão no coração nunca foi descrita (142). É importante referir que além dos OCTs, os novos transportadores de cationes orgânicos (OCTNs) também são responsáveis pelo transporte intermembranar de bases fracas (141, 143-145). Os OCTNs são especialmente

relevantes no transporte de carnitina e, embora o músculo cardíaco seja altamente dependente do transporte activo de carnitina do sangue, apenas o OCTN1 foi descrito em cardiomiócitos, até ao momento (141, 143-145).

Sabe-se que, em humanos, as concentrações de 10 μ M, 30 μ M e 0,1 μ M de CORT são descritas como as concentrações necessárias para produzir uma inibição de 50% dos transportadores OCT1, OCT2 e OCT3, respectivamente (146), razão pela qual a CORT é considerada um inibidor potente, selectivo e específico do OCT3 (147). É de notar que diferenças entre os transportadores de humanos e roedores podem ser decisivas para a afinidade e selectividade de substratos e inibidores (147). Embora a concentração de 100 μ M de CORT seja relatada como específica para inibição dos transportadores OCT3 em cardiomiócitos isolados de rato (132, 148), visando verificar a selectividade dessa mesma concentração, realizaram-se experiências utilizando 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M de CORT. Após 30 min de pré-incubação com estas 3 concentrações de CORT, as células foram incubadas com *m*-sinefrina (1 mM) por 3 h. Não foram observadas diferenças na magnitude de inibição obtida nas diferentes concentrações de CORT testadas. Assim, seleccionou-se a concentração de CORT descrita como selectiva para o OCT3 em cardiomiócitos isolados de rato (100 μ M) (140).

É de referir que a quinidina é considerada um inibidor inespecífico, uma vez que já foi descrita como inibidora do OCT1 (146), do OCTN2 (149) e do transportador membranal plasmático das monoaminas (PMAT) (150). Até o momento, o OCTN2 não foi descrito em cardiomiócitos (141, 143-145). Embora o PMAT também seja capaz de transportar catiões orgânicos e do seu mRNA já ter sido descrito no coração, a sua proteína nunca foi encontrada a nível cardíaco (150, 151). Muitos substratos dos OCTs e OCTNs exibem inibição mútua (142). Um estudo demonstrou que a quinidina na concentração de 100 μ M não inibe o OCT3 nos cardiomiócitos isolados de rato adulto (132). Portanto, na concentração utilizada, podemos assegurar que a quinidina inibe selectivamente o OCT1 (140). A quinidina também é substrato da glicoproteína-P (P-gp). Porém, a actividade desta glicoproteína está ausente no modelo celular utilizado nesta dissertação, (132) além de que a sinefrina não é um substrato desta glicoproteína (152).

Através deste estudo de transporte, foi possível evidenciar pela primeira vez o envolvimento do OCT1 e do OCT3 no transporte da *p*- e *m*-sinefrina em cardiomiócitos tolerantes ao cálcio isolados de rato adulto (140). A adrenalina, cuja estrutura química é semelhante à sinefrina (Figura 4), é transportada pelo OCT3, mas não pelo OCT1 (132). Assim, é possível inferir que a cadeia lateral etilamina é mais relevante do que o anel catecol para a afinidade pelo OCT3, enquanto que a presença de apenas um hidroxilo no anel aromático favorece o transporte pelo OCT1.

IV.4) A sinefrina e a depleção de glutatonas em cardiomiócitos isolados de rato

Como já mencionado nesta dissertação, a sinefrina possui estrutura química similar a compostos que apresentam cardiotoxicidade associada ao stress oxidativo, nomeadamente a anfetamina, a efedrina, a noradrenalina e a adrenalina (Figura 4). No entanto, não existem, segundo julgamos saber, estudos mecanísticos visando esclarecer esta suposta cardiotoxicidade da sinefrina e a sua relação com o stress oxidativo, apesar da grande difusão da sinefrina como composto dietético estar acompanhada de relatos de eventos adversos que afectam o sistema cardiovascular (84, 88-90, 94). Desta forma, os níveis de GSht, GSH e GSSG em cardiomiócitos isolados de rato após incubação com *p*- ou *m*-sinefrina foram avaliados, como se pode observar no manuscrito II da presente dissertação (140). Desta maneira, um dos mecanismos pelo qual a toxicidade cardíaca da *m*-sinefrina é exercida, ou pelo menos potenciada, parece ser a diminuição dos níveis de glutatona (ver manuscrito II) (140). Embora o isómero *p*- substituído apresente níveis de incorporação nos cardiomiócitos significativamente mais elevados, apenas a *m*-sinefrina promoveu depleção nos níveis intracelulares de GSht e GSH (140). As baixas concentrações internalizadas de *m*-sinefrina foram suficientes para causar tais alterações (140), evidenciando um maior efeito cardiotóxico deste isómero. A depleção da glutatona tem sido associada com alterações na electrofisiologia cardíaca (153, 154). Estudos sugerem uma estreita relação entre a diminuição dos níveis cardíacos da GSH e uma maior vulnerabilidade a arritmias, enfarte do miocárdio e ataques cardíacos (153, 154).

Curiosamente, as diminuições nos níveis de GSht e GSH observadas após incubação com a *m*-sinefrina não foram acompanhadas pelo aumento nos níveis da GSSG (140). É possível que a GSSG formada no interior dos cardiomiócitos possa estar a ser exportada pelos transportadores da família das proteínas de resistência a múltiplas drogas (MRP) para o meio extracelular (132, 155). Outra hipótese é que a diminuição da GSH e GSht esteja relacionada com a formação de aductos ou conjugados com a glutatona, a exemplo do que acontece com a adrenalina (102, 130).

Os dois antioxidantes utilizados, NAC (1 mM) e Tiron (100 μ M) foram capazes de prevenir a depleção da GSht e GSH observada em cardiomiócitos incubados com *m*-sinefrina (1 mM) (140). Como já foi referido nesta dissertação, estes antioxidantes possuem mecanismos distintos: o Tiron é um composto que mimetiza a acção da SOD,

capturando os aniões $O_2^{\bullet-}$ (99) e o NAC é um nucleófilo que actua sobre as espécies reactivas H_2O_2 e HO^{\bullet} (96), além de ser um precursor de GSH (156). Porém, a acção do NAC como precursor de GSH não possui relevância nos estudos protectores realizados no âmbito desta dissertação, uma vez que foram utilizados tempos de incubação muito curtos, nomeadamente de 3 h, onde não se verificou aumento da GSH no grupo NAC relativamente ao grupo controlo (ver manuscripto II, secção 3) (140).

Sabe-se que a estimulação de receptores α_1 adrenergicos pode promover um aumento das ROS, que actuam como sinalizadores intracelulares para processos biológicos como, por exemplo, o crescimento celular normal e as reacções hipertróficas que podem resultar em falha cardíaca (157). Como já mencionado nesta dissertação, a *m*-sinefrina é um agonista adrenérgico com maior potência nos receptores α_1 quando comparado ao isómero *p*- (26). Aliás, os efeitos adversos cardiovasculares da *m*-sinefrina são frequentemente atribuídos à sua pronunciada acção como agonista dos receptores α_1 adrenérgicos (66, 140, 158-160). Assim, o aumento das espécies reactivas observado apenas com a *m*-sinefrina em cardiomiócitos poderia estar relacionado com a sua maior acção α_1 adrenérgica. Visando esclarecer esta hipótese, realizou-se um estudo em que cardiomiócitos foram pré-incubados por 30 min com prazosina (100 nM), um antagonista selectivo dos receptores α_1 adrenérgicos, antes da incubação com a *m*-sinefrina (1 mM). Com este estudo, foi possível demonstrar que a depleção nos níveis de GSht e GSH promovido pela *m*-sinefrina em cardiomiócitos é independente da estimulação dos receptores α_1 , uma vez que a pré-incubação com a prazosina não foi capaz de prevenir as alterações nos níveis de GSht e GSH desencadeadas pela incubação com a *m*-sinefrina (ver artigo II, secção 3) (140). Assim, os resultados apresentados demonstram que a diminuição da GSht e GSH promovida pela *m*-sinefrina (1 mM) está relacionada com o aumento na geração de espécies reactivas desencadeada pela própria *m*-sinefrina interiorizada (140). Possivelmente, à semelhança do que acontece com a adrenalina (102), a molécula da *m*-sinefrina sofre auto-oxidação no interior dos cardiomiócitos. É de notar que a oxidação da sinefrina já foi descrita na literatura (161).

IV.5) Considerações finais

No âmbito desta dissertação, foi desenvolvido um método por GC/IT-MS para a quantificação simultânea da *p*- e *m*-sinefrina em matrizes celulares (ver manuscrito I)

(134). O método foi validado para um grande intervalo de concentrações e apresenta baixos LOD e LOQ (134).

A metodologia de quantificação simultânea dos isómeros da sinefrina validada no âmbito dos trabalhos apresentados nesta dissertação permitiu o estudo da internalização mediada por OCTs da *p*- e *m*-sinefrina em cardiomiócitos de rato (ver manuscrito II, secção 3) (134). Foi possível evidenciar que ambos os isómeros posicionais são transportados via OCT1 e OCT3 para o interior dos cardiomiócitos, porém, estes transportadores favorecem a posição *p*- no anel aromático (140).

Os resultados apresentados nesta dissertação comprovam que, efectivamente, a isomeria posicional da sinefrina determina perfis de toxicidades distintos (140). Existem poucos estudos toxicológicos com a sinefrina e, embora a *m*-sinefrina se encontre efectivamente presente em suplementos dietéticos (2-4, 21, 22, 73), a grande maioria dos trabalhos disponíveis abordando o uso da sinefrina na promoção do emagrecimento avalia apenas a *p*-sinefrina (15, 77, 80). Consistente com os resultados apresentados nesta dissertação, os estudos existentes evidenciam uma baixa toxicidade do isómero de ocorrência natural (15, 77, 80, 140). No entanto, esta observação encontra-se discrepante com o aumento dos relatos de efeitos adversos, especialmente os que afectam o sistema cardiovascular, associados ao consumo da sinefrina como agente promotor do emagrecimento (84, 88-90, 94). As discrepâncias entre os estudos académicos e os relatos de casos poderiam ser explicadas pela ausência de trabalhos que abranjam os dois isómeros posicionais da sinefrina consumidos pela população. Por essas razões, é importante que os estudos toxicológicos avaliem a segurança não apenas do isómero de ocorrência natural, mas sim, das duas moléculas presentes nos suplementos alimentares e, em especial, a nível cardiovascular, como realizado na presente dissertação.

Secção V)

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Watson DG, Midgley JM, Chen RN, Huang W, Bain GM, McDonald NM, Reid JL, McGhee CNJ. Analysis of biogenic amines and their metabolites in biological tissues and fluids by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry (GC-NICI/MS). *J Pharm Biomed Anal.* 1990;8:899-904.
2. Santana J, Sharpless KE, Nelson BC. Determination of *p*-synephrine and *m*-synephrine positional isomers in bitter orange-containing supplements by LC/UV and LC/MS/MS. *Food Chem.* 2008;109:675-82.
3. Haaz S, Fontaine KR, Cutter G, Limdi N, Perumean-Chaney S, Allison DB. *Citrus aurantium* and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update. *Obes Rev.* 2006;7:79-88.
4. Allison DB, Cutter G, Poehlman ET, Moore DR, Barnes S. Exactly wich synephrine alkaloids does *Citrus aurantium* (Bitter Orange) contain? *Int J Obes.* 2005;29:443-6.
5. Fugh-Berman A, Myers A. *Citrus aurantium*, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research. *Exp Biol Med.* 2004 Sep;229(8):698-704.
6. Arias BA, Ramón-Laca L. Pharmacological properties of citrus and heir ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *J Ethnopharmacol.* 2005;97:89-95.
7. Blanck HM, Serdula MK, Gillespie C, Galuska DA, Sharpe PA, Conway JM, Khan LK, Ainsworth BE. Use of nonprescription dietary supplements for weight loss is common among Americans. *J Am Diet Assoc.* 2007:441-7.
8. WADA. World Anti-Doping Agency. [cited 2010 27 Feb]; Available from: www.wada-ama.org.

9. Jordan S, Murty M, Pilon K. Products containing bitter orange or synephrine: suspected cardiovascular adverse reactions. *Can Med Assoc J.* 2004 Oct 12;171(8):993-4.
10. Grollman AP. Academic perspectives on dietary supplements use: The need for new guidelines. *Thromb Res.* 2005;185-92.
11. Haller CA, Benowitz NL, Jacob P. Hemodynamic effects of ephedra-free weight-loss supplements in humans. *Am J Med.* 2005;118(9):998-1003.
12. Avula B, Upparapalli SK, Navarrete A, Khan IA. Simultaneous quantification of adrenergic amines and flavonoids in *Citrus aurantium*, various *Citrus* species, and dietary supplements by liquid chromatography. *J AOAC Int.* 2005;88(6):1593-606.
13. Hibino T, Yuzurihara M, Kanno H, Kase Y, Takeda A. Goshuyuto, a traditional Japanese medicine, and aqueous extracts of *Evodiae fructus* constrict isolated rat aorta via adrenergic and/or serotonergic receptors. *Biol Pharm Bull.* 2009 Feb;32(2):237-41.
14. Chen G, Zhang L, Zhao J, Ye J. Determination of hesperidin and synephrine in *Pericarpium Citri Reticulatae* by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Anal Bioanal Chem.* 2002 Jun;373(3):169-73.
15. Arbo MD, Larentis ER, Linck VM, Aboy AL, Pimentel AL, Henriques AT, Dallegrave E, Garcia SC, Leal MB, Limberger RP. Concentrations of *p*-synephrine in fruits and leaves of *Citrus* species (Rutaceae) and the acute toxicity testing of *Citrus aurantium* extract and *p*-synephrine. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:2770-5.
16. Pellati F, Benvenuti S, Melegari M. Enantioselective LC analysis of synephrine in natural products on a protein-based chiral stationary phase. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;37:839-49.
17. Dwyer JT, Allison DB, Coates PM. Dietary supplements in weight reduction. *J Am Diet Assoc.* 2005;105:S80-S6.
18. Chang HM, But PPH. *Pharmacology and applications of Chinese materia medica.* Singapore: World Scientific; 1986.

19. Pellati F, Benvenuti S. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of phenethylamine alkaloids in *Citrus aurantium* J Chromatogr A. 2007;1161:71-88.
20. Andrade AS, Schmitt GC, Rossato LG, Russowsky D, Limberger RP. Gas chromatographic method for analysis of *p*-synephrine in *Citrus aurantium* L. products. Chromatographia. 2009:S225-S9.
21. Penzak SR, Jann MW, Cold JA, Hon YY, Desai HD, Gurley BJ. Seville orange juice: synephrine content and cardiovascular effects in normotensive adults. J Clin Pharmacol. 2001;41:1059-63.
22. Bent S, Padula A, Neuhaus J. Safety and Efficacy of *Citrus aurantium* for weight loss. Am J Cardiol. 2004;94:1359-61.
23. D'Andrea G, Terrazzino S, Leon A, Fortin D, Perini F, Granella F, Bussone G. Elevated levels of circulating trace amines in primary headaches. Neurology. 2004;62:1701-5.
24. Zucchi R, Chiellini G, Scanlan TS, Grandy DK. Trace amine-associated receptors and their ligands. Br J Pharmacol. 2006;146:967-78.
25. Andrade AS. Estabelecimento e validação de metodologia para quantificação de *p*-sinefrina em produtos derivados de *Citrus aurantium* por cromatografia a gás. Porto Alegre, Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); 2008.
26. Brown CM, McGrath JC, Midgley JM, Muir AG, O'Brien JW, Thonoor CM, Williams CM, Wilson VG. Activities of octopamine and synephrine stereoisomers on alpha-adrenoceptors. Br J Pharmacol. 1988 Feb;93(2):417-29.
27. Durden DA, Phillips SR. Kinetic measurements of the turnover rates of phenylethylamine and tryptamine in vivo in the rat brain. J Neurochem. 1980;34:1725-32.
28. Grandy DK. Trace amine-associated receptor 1 - Family archetype or iconoclast? Pharmacol Ther. 2007;116(3):335-90.
29. Maguire JJ, Parker WAE, Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Davenport AP. International union of pharmacology. LXXII. Recommendations for trace amine receptor nomenclature. Pharmacol Rev. 2009;61:1-8.

30. D'Andrea G, Granella F, Cadaldini M. Platelet aggregation profiles in cluster headache. *Headache*. 2003;43(3):272-5.
31. D'Andrea G, Nordera GP, Perini F, Allais G, Granella F. Biochemistry of neuromodulation in primary headaches: focus on anomalies of tyrosine metabolism. *Pharmacol Pathophysiol Neuromodulation*. 2007;28:S94-S6.
32. Lindemann L, Hoener MC. A renaissance in trace amines inspired by a novel GCPR family. *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26(5):274-81.
33. Branchek TA, Blackburn TP. Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: legend, myth and fact. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3:90-7.
34. Shimazu S, Miklya I. Pharmacological studies with endogenous enhancer substances: Beta-phenylethylamine, tryptamine, and their synthetic derivatives. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004;28:421-7.
35. Bunzow JR, Sonders MS, Arttamangkul S, Harrison LM, Zhang GE, Quigley DI. Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of the rat trace amine receptor. *Mol Pharmacol*. 2001;60:1181-8.
36. Moro CO, Basile G. Obesity and medicinal plants. *Fitoterapia*. 2000;71:S73-S82.
37. Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11 ed: McGraw-Hill; 2005.
38. Martindale. Phenylephrine. The complete drug reference. London, UK: Electronic version; 2004.
39. Kim KW, Kim HD, Jung JS, Woo RS, Kim HS, Suh HW, Kim YL, Song DK. Characterization of antidepressant-like effects of *p*-synephrine stereoisomers. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2001;364:21-6.
40. Song DK, Suh HW, Jung JS, Wie MB, Son KH, Kim YH. Antidepressant-like effects of *p*-synephrine in mouse models of immobility tests. *Neurosci Lett*. 1996;214:107-10.

41. Song LS, Guatimosim S, Gomez-Viquez L, Sobie EA, Ziman A, Hartmann H, Lederer WJ. Calcium biology of the transverse tubules in heart. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005 Jun;1047:99-111.
42. Hibino T, Yuzurihara M, Kase Y, Takeda A. Synephrine, a component of *Evodiae fructus*, constricts isolated rat aorta via adrenergic and serotonergic receptors. *J Pharmacol Sci*. 2009;111:73-81.
43. Strader CD, Candelore MR, Hill WS, Sigal IS, Dixon RA. Identification of two serine residues involved in agonist activation of the beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 1989;264(13572-13578):13572-8.
44. Bouchard NC, Howland MA, Greller HA, Hoffman RS, Nelson LS. Ischemic stroke associated with use of an "Ephedra-Free" dietary supplement containing synephrine. *Mayo Clin Proc*. 2005;80(4):541-5.
45. Suzuki O, Matsumoto T, Oya M, Katsumata Y. Oxidation of synephrine by type A and type B monoamine oxidase. *Cell and Mol Life Sci*. 1979;35(10):1283-4.
46. Frascarelli S, Ghelardoni S, Chiellini G, Vargiu R, Ronca-Testoni S, Scanlan TS, Grandy DK, Zucchi R. Cardiac effects of trace amines: pharmacological characterization of trace amine-associated receptors. *Eur J Pharmacol*. 2008;587:231-6.
47. Hengstmann JH, Aulepp H. Pharmacokinetics and metabolism of 3H-synephrine. *Arzneimittelforschung*. 1978;28(12):2326-31.
48. Barnes S, Prasain JK, Wang CC, Moore II DR. Applications of LC/MS in the study of the uptake, distribution, metabolism and excretion of bioactive polyphenols from dietary supplements. *Life Sci*. 2006;78:2054-9.
49. Ibrahim KE, Midgley JM, Crowley JR, Williams CM. The mammalian metabolism of R-(-)-m-synephrine. *J Pharm Pharmacol*. 1983 Mar;35(3):144-7.
50. Kusu F, Matsumoto K, Arai K, Takamura K. Determination of synephrine enantiomers in food and conjugated synephrine in urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Biochem*. 1996 Mar 15;235(2):191-4.

51. Haller CA, Duan M, Jacob P, 3rd, Benowitz N. Human pharmacology of a performance-enhancing dietary supplement under resting and exercise conditions. *Br J Clin Pharmacol*. 2008 Jun;65(6):833-40.
52. Malhotra S, Bailey DG, Paine MF, Watkins PB. Seville orange juice-felodipine interaction: comparison with dilute grapefruit juice and involvement of furocoumarins. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Jan;69(1):14-23.
53. Dresser G, Spence J, Bailey D. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet*. 2000;Jan 38(1):41-57.
54. WHO. World Health Organization, Obesity and overweight. 2009 [cited 2010 1 March]; Available from: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en/>.
55. Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, VanItallie TB. Annual deaths attributable to obesity in the United States. *JAMA* 1999;282:1530-8.
56. Fontaine KR, Bartlett SJ, Barofsky I. Health-related quality of life among obese persons seeking and not currently seeking treatment. *Int J of Eat Disord*. 2000;27:101-5.
57. Saper RB, Eisenberg DM, Phillips RS. Common dietary supplements for weight loss. *Am Fam Physician*. 2004;70:1731-8.
58. Europeu P. Directiva 2002/46/CE 2002. p. Jornal Oficial nº L 183 de 12/07/2002 p. 51 - 57.
59. Saper RB, Kales SN, Paquin J, Burns MJ, Eisenberg DM, Davis RB, Phillips RS. Heavy metal content of ayurvedic herbal medicine products. *JAMA* 2004 Dec 15;292(23):2868-73.
60. Ko RJ. Adulterants in Asian patent medicines. *N Engl J Med*. 1998 Sep 17;339(12):847.
61. Ernst E. Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review. *J Int Med*. 2002 Aug;252(2):107-13.

62. Linck VM, Thiesen FV, Leal MB. *Citrus aurantium*: comercialização em farmácias e drogarias e riscos à saúde. *Revista Brasileira de Toxicologia*. 2006;19(2):89-94.
63. Bray GA. Drug treatment of obesity. *Baillière's best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 1999 Apr;13(1):131-48.
64. Ricca V, Castellini G, Mannucci E, Monami M, Ravaldi C, Gorini Amedei S, Lo Sauro C, Rotella CM, Faravelli C. Amphetamine derivatives and obesity. *Appetite*. 2009 Apr;52(2):405-9.
65. Moyers SB. Medications as adjunct therapy for weight loss: approved and off-label agents in use. *J Am Diet Assoc*. 2005 Jun;105(6):948-59.
66. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Rang and Dale's Pharmacology*. Churchill Livingstone; 2007. p. 168-89.
67. Carmo H. Estudo da influência do metabolismo na toxicidade de derivados anfetamínicos: 4-MTA, 2C-B e MDMA. Porto, Portugal: Porto University; 2007.
68. Soni GM, Carabin IG, Griffiths JC, Burdock GA. Safety of ephedra: lessons learned. *Toxicol Lett*. 2004;150:97-110.
69. Kristel D, Westertep KR, Westertep-Plantenga MS. Obesity and thermogenesis related to the consumption of caffeine, ephedrine, capsaicin, and green tea. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292:R77-R85.
70. Hoffman BB, Lefkowitz RJ. *Catecholamines and sympathomimetic drugs*. McGraw Hill ed. New York 1996.
71. Haller CA, Benowitz NL. Adverse cardiovascular and central nervous system events associated with dietary supplements containing *Ephedra* alkaloids. *New Engl J Med*. 2000;343(25):1833-8.
72. Niemann RA, Gay ML. Determination of ephedrine alkaloids and synephrine in dietary supplements by column-switching cation exchange high-performance liquid chromatography with scanning-wavelength ultraviolet and fluorescence detection. *J Agric Food Chem*. 2003;51:5630-8.

73. Greenway F, Jonge-Levitan L, Martin C, Roberts A, Grundy I, Parker C. Dietary herbal supplements with phenylephrine for weight loss. *J Med Food*. 2006;9(4):572-8.
74. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger- Principles of Biochemistry*. 4th ed: W. H. Freeman; 2004.
75. Hoffman JR, Kang J, Ratamess NA, Jennings PF, Mangine G, Faigenbaum AD. Thermogenic effect from nutritionally enriched coffee consumption. *J Int Soc Sports Nutr*. 2006;3:35-41.
76. Carpéné C, Galitzky J, Fontana E, Atgié C, Lafontan M, Berlan M. Selective activation of beta3-adrenoceptors by octopamine: comparative studies in mammalian fat cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1999;359(4):310-21.
77. Arbo MD, Schmitt GC, Limberger MF, Charao MF, Moro AM, Ribeiro GL, Dallegrave E, Garcia SC, Leal MB, Limberger RP. Subchronic toxicity of *Citrus aurantium* L. (*Rutaceae*) extract and *p*-synephrine in mice. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2009 Mar 9.
78. Calapai G, Firenzuoli F, Saitta A, Squadrito F, Arlotta MR, Constantino G, Infrerera G. Antiobesity and cardiovascular toxic effects of *Citrus aurantium* extracts in the rat: a preliminary report. *Fitoterapia*. 1999;70:586-92.
79. Hoffman JR, Kang J, Ratamess NA, Rashti SL, Tranchina CP, Faigenbaum AD. Thermogenic effect of an acute ingestion of a weight loss supplement. *J Int Soc Sports Nutr*. 2009;6:1-6.
80. Arbo MD, Franco MT, Larentis ER, Garcia SC, Sebben VC, Leal MB, Dallegrave E, Limberger RP. Screening for *in vivo* (anti)estrogenic activity of ephedrine and *p*-synephrine and their natural sources *Ephedra sinica* Stapf. (*Ephedraceae*) and *Citrus aurantium* L. (*Rutaceae*) in rats. *Arch Toxicol*. 2008.
81. Sultan S, Spector J, Mitchell RM. Ischemic Colitis associated with use of a Bitter Orange containing dietary weight-loss supplement. *Mayo Clin Proc*. [Case Report]. 2006;81(12):1630-1.
82. Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004 Oct 29;95(9):911-21.

83. Kang YJ. Toxic Responses of the Heart and Vascular System In: Casarett and Doull's - Toxicology the Basic Science of Poisons. New York: McGraw-Hill; 2008.
84. Bui LT, Nguyen DT, Ambrose PJ. Blood pressure and heart rate effects following a single dose of bitter orange. *Ann Pharmacother*. 2006;40:53-7.
85. Thomas SH, Clark KL, Allen R, Smith SE. A comparison of the cardiovascular effects of phenylpropanolamine and phenylephrine containing proprietary cold remedies. *Br J Clin Pharmacol*. 1991 Dec;32(6):705-11.
86. Hofstetter R, Kreuder J, von Bernuth G. The effect of oxedrine on the left ventricle and peripheral vascular resistance. *Arzneimittelforschung*. 1985;35(12):1844-6.
87. Zhao XW, Li JX, Zhu ZR, Sun DQ, Liu SC. Anti-shock effects of synthetic effective compositions of fructus aurantii immaturus. Experimental study and clinical observation. *Chin Med J*. 1989 Feb;102(2):91-3.
88. Gange CA, Madias C, Felix-Getzik EM, Weintraub AR, Estes NAM. Variant angina associated with bitter orange in a dietary supplement. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(4):545-8.
89. Nykamp DL, Fackih MN, Compton AL. Possible association of acute lateral-wall myocardial infarction and bitter orange supplement. *Ann Pharmacother*. 2004;38(5):812-6.
90. Thomas JE, Munir JA, McIntyre PZ, Ferguson MA. STEMI in a 24-year-old man after use of a synephrine-containing dietary supplement: a case report and review of the literature. *Text Heart Inst J*. 2009;36(6):586-90.
91. Stephensen TA, Sarley RJ. Ventricular fibrillation associated with use of synephrine containing dietary supplement *Mil Med*. 2009;Dec; 174(12):1313-9.
92. Marcus DM, Grollman A. Ephedra-free is not Danger-free. *Science*. 2003;301:166.
93. Ledda F, Mantelli L, Mugelli A. Alpha-sympathomimetic amines and calcium-mediated action potentials in guinea-pig ventricular muscle. *Br J Pharmacol*. 1980;69:565-71.

94. Nasir JM, Durning S, Ferguson M, Barold HS, Haigney MC. Exercise-induced syncope associated with QT-prolongation and ephedra-free Xenadrine. *Mayo Clin Proc.* 2004;78(8):1059-62.
95. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
96. Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidant defenses. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University; 1998. p. 105-245.
97. Carvalho M, Remião F, Milhazes N, Borges F, Fernandes E, Carvalho F, Bastos ML. The toxicity of N-methyl-[alpha]-methyldopamine to freshly isolated rat hepatocytes is prevented by ascorbic acid and N-acetylcysteine. *Toxicology.* 2004;200(2-3):193-203.
98. Sadowska AM, Verbraecken J, Darquennes K, Backer WAD. Role of N-acetylcysteine in the management of COPD. *Ther Clin Risk Manag.* 2006;2(1):3-18.
99. Ghosh M, Wang HD, McNeill R. Tiron exerts effects unrelated to its role as a scavenger os superoxide anion: effects on calcium binding and vascular reponses. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002;80:755-60.
100. Marklund S, Westman N, Lundgren E, Roos G. Cooper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissue. *Canc Res.* 1982;42:1955-61.
101. Costa VM. Role of catecholamines and reactive oxygen species in the mecanism of oxidative stress-induced heart disease: *in vitro* studies using freshly isolated rat cardiomyocytes. Porto, Portugal: Porto University; 2009.
102. Costa VM, Silva R, Ferreira ML, Branco PS, Carvalho F, Bastos ML, Carvalho RA, Carvalho M, Remião F. Oxidation process of adrenaline in freshly isolated rat cardiomiocytes: formation of adrenochrome, quinoproteins and GSH adduct. *Chem Res Toxicol.* 2007;20(8):1183-91.

103. Remião F, Carvalho M, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML. Cu⁺² induced isoproterenol oxidation into isoprenochrome in adult rat calcium-tolerant cardiomyocytes. *Chem Res Toxicol*. 2002;15:861-9.
104. Remião F, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML. Copper enhances isoproterenol toxicity in isolated rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Toxicol*. 2001:195-204.
105. Kovacic P, Cooksy AL. Unifying mechanism for toxicity and addiction by abused drugs: electron transfer and reactive oxygen species. *Med Hypotheses*. 2005;64:357-66.
106. Yamamoto BK, Zhu W. The effects of metamphetamine on the production of free radicals and oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;287:107-14.
107. Shankaran M, Yamamoto BK, Gudelsky GA. Ascorbic acid prevents 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced hydroxyl radical formation and the behavioral and neurochemical consequences of the depletion of brain 5-HT. *Synapse*. 2001;40(1):55-64.
108. Brown JM, Yamamoto BK. Effects of amphetamines on mitochondrial function: role of free radicals and oxidative stress. *Pharmacol Ther*. 2003;99:45-53.
109. Roman MC, Betz JM, Hildreth J. Determination of synephrine in bitter orange raw materials, extracts, and dietary supplements by liquid chromatography with ultraviolet detection: single-laboratory validation. *J AOAC Int*. 2007 Jan-Feb;90(1):68-81.
110. Pellati F, Benvenuti S, Melegari M, Firenzuoli F. Determination of adrenergic agonists from extracts and herbal products of *Citrus aurantium L. var. amara* by LC. *J Pharm Biomed Anal*. 2002 Aug 1;29(6):1113-9.
111. Tang F, Tao L, Luo X, Ding L, Guo M, Nie L, Yao S. Determination of octopamine, synephrine and tyramine in Citrus herbs by ionic liquid improved 'green' chromatography. *J Chromatogr A*. 2006 Sep 1;1125(2):182-8.
112. Marchei E, Pichini S, Pacifici R, Pellegrini M, Zuccaro P. A rapid and simple procedure for determination of synephrine in dietary supplements by gas-chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;41:1468-72.
113. Putzbach K, Rimmer CA, Sharpless KE, Sander LC. Determination of Bitter Orange alkaloids in dietary supplements standard reference materials by liquid

chromatography with ultraviolet absorbance and fluorescence detection. J Chromatogr A. 2007;1156:304-11.

114. Gay ML, Niemann RA, Musser SM. An isotopically labeled internal standard liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of ephedrine alkaloids and synephrine in dietary supplements. J Agric Food Chem. 2006 Jan 25;54(2):285-91.

115. Ganzera M, Lanser C, Stuppner H. Simultaneous determination of *Ephedra sinica* and *Citrus aurantium* var. *amara* alkaloids by ion-pair chromatography. Talanta. 2005 May 15;66(4):889-94.

116. Schaneberg BT, Khan IA. Quantitative and qualitative HPLC analysis of thermogenic weight loss products. Pharmazie. 2004 Nov;59(11):819-23.

117. Beyer J, Peters F, Kraemer T, Maurer HH. Detection and validated quantification of nine herbal phenalkylamines and methcathinone in human blood plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization. J Mass Spectrom. 2007;42:150-60.

118. Anderle P, Niederer E, Rubas W, Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Wunderli-Allenspach H, Merkle HP, Langguth P. P-Glycoprotein (P-gp) mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: the influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels. J Pharm Sci. 1998;87(6):757-62.

119. Yamashita S, Konishi K, Yamazaki Y, Taki Y, Sakane T, Sasaki H, Furuyama Y. New and better protocols for a short-term Caco-2 cell culture system. J Pharm Sci. 2002;91(3):669-79.

120. Huynh-Delerme C, Huet H, Noel L, Frigieri A, Kolf-Clauw M. Increased functional expression of P-glycoprotein in Caco-2 TC7 cells exposed long-term to cadmium. Toxicol In Vitro. 2005;19(4):439-47.

121. Korjamo T, Honkakoski P, Marjo-Riitta T, Niva S, Reinisalo M, Palmgrén JJ, Monkkonen J. Absorption properties and P-glycoprotein activity of modified Caco-2 cell lines. Eur J Pharm Sci. 2005;26:266-79.

122. Martel F, Grudenmann C, Calhau C, Schomig E. Apical uptake of organic cations by human intestinal Caco-2 cells: putative involvement of ASF transporters. Arch Pharmacol. 2001;363:40-9.

123. Costa JL. Extração em Fase Sólida. In: Moreau RLM, Siqueira MEP, editors. Toxicologia Analítica. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan; 2008. p. 156-60.
124. Kataoka H. Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis. J Chromatogr A. 1996;733:19-34.
125. Chacon E, Bond JM, Lemasters JJ. Evaluation of *in vitro* cytotoxicity modeling. In: Acosta DJ, editor. Cardiovascular Toxicology. London: Taylor & Francis; 2001. p. 59-78.
126. Hescheler J, Meyer R, Plant S, Krautwurst D, Rosenthal W, Shultz G. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. Circ Res. 1991;69:1476-86.
127. Kimes BW, Brant BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. Exp Cell Res. 1976;15:367-81.
128. Remião F, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML. The study of oxidative stress in freshly isolated Ca^{2+} tolerant cardiomyocytes from the adult rat. Toxicol In Vitro. 2001;15:283-7.
129. Claycomb WC, Burns AH, Shepard RE. Culture of the terminally differentiated ventricular cardiac muscle cell. FEBS Lett. 1984;169:261-6.
130. Costa VM, Silva R, Tavares LC, Vitorino R, Amado F, Carvalho F, Bastos ML, Carvalho M, Carvalho RA, Remião F. Adrenaline and reactive oxygen species elicit proteome and energetic metabolism modifications in freshly isolated rat cardiomyocytes. Toxicology. 2009;260:84-96.
131. Costa VM, Silva R, Ferreira R, Amado F, Carvalho F, de Lourdes Bastos M, Carvalho RA, Carvalho M, Remião F. Adrenaline in pro-oxidant conditions elicits intracellular survival pathways in isolated rat cardiomyocytes. Toxicology. 2009;257(1-2):70-9.
132. Costa VM, Ferreira ML, Branco PS, Carvalho F, Bastos ML, Carvalho RA, Carvalho M, Remião F. Cross-functioning between the extraneuronal monoamine transporter and multidrug resistance protein 1 in the uptake of adrenaline and export of 5-(Glutathion-S-yl)adrenaline in rat cardiomyocytes. Chem Res Toxicol. 2009;22:129-35.

133. Remião F, Rettori D, Han D, Carvalho F, Bastos ML, Cadenas E. Leucoisoprenochrome-o-semiquinone formation in freshly isolated adult rat cardiomyocytes. *Chem Res Toxicol*. 2004;17:1584-90.
134. Rossato LG, Pinho PG, Silva R, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML, Costa VM, Remião F. Development and validation of a GC/IT-MS method for simultaneous quantitation of *para* and *meta*-synephrine in biological samples. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;52:721-6.
135. Artursson CA, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;46:27-43.
136. Ueda CT, Dzindzio BS. Bioavailability of quinidine in congestive heart failure. *Br J Clin Pharmacol*. 1981;11(6):571-7.
137. Hengstmann JH, Weyand U, Dengler HJ. The physiological disposition of etilefrine in man. *Eur J Clin Pharmacol*. 1975;19:179-87.
138. Basit AW, Podczec F, Newton JM, Waddington WA, Ell PJ, Lacey LF. The use of formulation technology to assess regional gastrointestinal drug absorption in humans. *Eur J Pharm Sci*. 2004;21:179-89.
139. Siissalo S, Laine L, Tolonen A, Kaukonen AM, Finel M, Hirvonen J. Caco-2 cell monolayers as a tool to study simultaneous phase II metabolism and metabolite efflux of indomethacin, paracetamol and 1-naphthol. *Int J Pharm*. 2009;383(1-2):24-9.
140. Rossato LG, Costa VM, Pinho PG, Carvalho F, Bastos ML, Remião F. Structural isomerization of synephrine influences its uptake and ensuing glutathione depletion in rat isolated cardiomyocytes. *Artigo Submetido*. 2010.
141. Wu X, George R, Huang W, Wang H, Conway S, Leibach F, Ganapathy V. Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta. *Biochem Biophys Acta*. 2000;1466:315-27.
142. Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific Organic Cation Transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res*. 2007;24:1227-51.

143. Grube M, Meyer zu Schwabedissen H, Prager D, Haney J, Moritz K, Meissner K, Rosskopf D, Eckel L, Bohm M, Jedlitschky G, Kroemer H. Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). *Circulation*. 2006;113:1114-22.
144. McBride BF, Yang T, Liu K, Urban TJ, Giacomini KM, Kim RB, Roden DM. The organic cation transporter, OCTN1, expressed in the human heart, potentiates antagonism of the HERG potassium channel. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009;54:63-71.
145. Iwata D, Kato Y, Wakayama T, Sai Y, Kubo Y, Iseki S, Tsujo A. Involvement of carnitine/organic cation transporter OCTN2 in distribution of its substrate carnitine to the heart. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2008;23(3):207-15.
146. Koepsell H. Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(7):375-81.
147. Hayger-Zillgen M, Bruss M, Bonish H. Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2, and hOCT3. *Br J Pharmacol*. 2002;136:829-36.
148. Obst O, Rose H, Kammermeier H. Characterization of catecholamine uptake₂ in isolated cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem*. 1996;163-164:181-3.
149. Ohashi R, Tamai I, Yabuuchi H, Nezu J, Oku A, Sai Y, Shimane M, Tsuji A. Na⁺ dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTNS): its pharmacological and toxicological relevance. *J Pharm Exp Ther*. 1999;291(2):778-84.
150. Engel K, Wang J. Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter. *Mol Pharmacol*. 2005;68:1397-407.
151. Engel K, Zhou M, Wang J. Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *J Biol Chem*. 2004;279:50042-9.
152. Nabekura T, Yamaki T, Kitagawa S. Effects of chemopreventive citrus phytochemicals on human P-glycoprotein and multidrug resistance protein 1. *Eur J Pharmacol*. 2008;600:45-9.

153. Sridhar A, Nishijima Y, Terentyev D, Khan M, Terentyeva R, Hamlin RL, Nakayama T, Gyorke S, Cardounel AJ, Carnes CA. Chronic heart failure and the substrate for atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2009;84:227-36.
154. Zheng MQ, Tang K, Zimmerman MC, Liu L, Xie B, Rozanski GJ. Role of gamma-glutamyl transpeptidase in redox regulation of K⁺ channel remodeling in postmyocardial infarction rat hearts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;297:C253-C62.
155. Cole SPC, Deeley RG. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27(8):438-46.
156. Forman M, Puett D, Cates C, McCroskey D, Beckman J, Greene H, Virmani R. Glutathione redox pathway and reperfusion injury. Effect of N-acetylcysteine on infarct size and ventricular function. *Circulation.* 1988;Jul 78(1):202-13.
157. Amin J, Xiao L, Pimental D, Pagano P, Singh K, Sawyer D, Colucci W. Reactive oxygen species mediate alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertroph in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;12:1099-104.
158. Navarro-Sobrinho M, Lorita J, Soley M, Ramirez I. Catecholamine-induced heart injury in mice: differential effects of isoproterenol and phenylephrine. *Histol Histopathol.* 2010;25(5):589-97.
159. Thomas GP, Tripathi RM. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists on ouabain-induced arrhythmias and cardiac arrest in guinea pig. *Br J Pharmacol.* 1986;89(2):385-8.
160. Terzic A, Vogel SM. On the mechanism of the positive inotropic action of the alpha-adrenoceptor agonist, phenylephrine, in isolated rat left aorta *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;257(1):520-9.
161. Garcia-Carmona F, Cabanes J, Garcia-Canovas F. Kinetic study of synephrine oxidation by mushroom tyrosinase. *Biochem Int.* 1987;14(6):1003-13.

U. PORTO



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

R. ANÍBAL CUNHA N.º164
4050-047 PORTO - PORTUGAL
WWW.FF.UP.PT